

“Efectos de recursos ricos en taninos sobre la biología y las comunidades de los parásitos gastrointestinales

TESIS DOCTORAL : CELIA ARROYO LÓPEZ

“Efectos de recursos ricos en taninos sobre la biología y las comunidades de los parásitos gastrointestinales en corderos”

Effects of tannin-rich resources on parasites' biology and communities of gastrointestinal nematodes in sheep”

MADRID 2015

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA





TESIS DOCTORAL

DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad

de Ciencias Biológicas

Programa: Biología Evolutiva y Biodiversidad.

Presentada y defendida por Celia ARROYO-LÓPEZ

(Mayo 2015)

Título:

“Efectos de recursos ricos en taninos sobre la biología y las comunidades de los parásitos gastrointestinales en corderos”

(“Effects of tannin- rich resources on parasites’ biology and communities of gastrointestinal nematodes in sheep”)

Director de Tesis Doctoral: **Dr. Hervé HOSTE**

UMR 1225 INRA/DGER Interactions Hôte-Agent Pathogène (ENVT, Toulouse, Francia)

Tutor Académico: **Dr. Eduardo LÓPEZ GARCÍA**

Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid

A mis padres

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS / ACKNOWLEDGMENTS	11
LISTADO DE PUBLICACIONES / LIST OF ARTICLES	17
LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS / LIST OF ABBREVIATIONS USED	21
RESUMEN / ABSTRACT	23
INTRODUCCIÓN / INTRODUCTION	25
1. Nemátodos gastrointestinales en pequeños rumiantes	27
1.1. Taxonomía	27
1.2. Caracteres morfológicos generales	28
1.3. Identificación de nemátodos gastrointestinales	29
2. Orden Strongylida	30
2.1. Superfamilia Trichostrongyloidea	30
2.1.1. Género <i>Haemonchus</i>	30
2.1.2. Género <i>Teladorsagia</i>	31
2.1.3. Género <i>Trichostrongylus</i>	32
2.1.4. Género <i>Nematodirus</i>	33
2.1.5. Género <i>Cooperia</i>	35
2.2. Ciclo biológico Trichostrongyloides típico	35
2.2.1. Fase preparasítica o exógena	35
2.2.2. Fase parasítica o endógena	36
2.2.3. Periodo prepatente	38
2.2.4. Hipobiosis	38
3. Orden Rhabditida	39
3.1. Superfamilia Rhabditoidea	39
3.1.1. Género <i>Caenorhabditis</i>	39
3.2. Ciclo biológico <i>Caenorhabditis elegans</i>	39
3.2.1. Larva Dauer	41
3.3. Identificación de las etapas del ciclo biológico de <i>C. elegans</i>	42
4. Gastroenteritis verminosas en los rumiantes	43
5. Impactos en la producción	44
5.1. Signos clínicos	44
5.1.1. Abomaso	44
5.1.2. Intestino	45
5.2. Mecanismos fisiopatológicos	45
5.2.1. Identificación de problemas a nivel abomasal	45
5.2.2. Identificación de problemas a nivel intestinal	45
5.3. Consecuencias en el hospedador	46

5.3.1. Disminución de la ingestión	46
5.3.2. Alteraciones gastrointestinales	46
5.3.3. Modificación y reorientación del metabolismo	47
5.4. Déficits zootécnicos	47
5.5. Mecanismos patogénicos de los vermes.....	47
5.5.1. Efectos mecánicos	48
5.5.2. Efecto de los productos de excreción y secreción	48
6. Respuesta inmunológica del hospedador y mecanismos de evitación parasitarios	49
7. Métodos de diagnóstico	50
7.1. Métodos indirectos	50
7.1.1. Evaluación de los elementos parasitarios	50
7.1.2. Evaluación de las perturbaciones patofisiológicas provocadas por los vermes.....	51
7.2. Métodos directos	51
7.2.1. Evaluación de la carga parasitaria.....	51
7.2.2. Respuesta de los hospedadores a los vermes	51
8. Control farmacológico: métodos antihelmínticos convencionales y sus limitaciones	52
8.1. Clasificación de los antihelmínticos de síntesis	52
8.1.1. Benzimidazoles (BDZ) y pro-benzimidazoles	52
8.1.2. Salicilanilidas	53
8.1.3. Imidazotiazoles y tetrahidropirimidinas	53
8.1.4. Lactonas macrocíclicas	53
8.1.5. Amino acetonitril derivados: Monepantel.....	54
9. Límites a la utilización de los antihelmínticos de síntesis	56
9.1. Fenómenos de ecotoxicidad	56
9.2. Aparición de residuos en los productos derivados	56
9.3. Aparición de fenómenos de resistencia en los parásitos	57
10. Lucha y prevención de la aparición de resistencias a los Antihelmínticos	58
10.1. Una mejor utilización de los Antihelmínticos de síntesis disponibles.....	58
10.1.1. Aplicación del principio de refugio	58
10.1.2. Alternar familias de antihelmínticos	58
10.1.3. Aplicación de dosis adaptadas	59
10.2. Desarrollo de métodos alternativos	59
10.3. Actuación sobre las fuentes de contaminación	60
10.3.1. Agotar la fuente de contaminación de los animales	60
10.3.2. Métodos de dilución.....	60
10.3.3. Rotación de parcelas.....	60
10.3.4. Descontaminación activa de los pastos.....	60
10.4. Mejora de la tolerancia y/o resistencia del hospedador	62
10.4.1. Vacunación.....	62

10.4.2. Selección genética	63
10.4.3. Mejora de la ración del hospedador	64
10.5. Modulación de la biología de los Nematodos gastrointestinales a través de sustancias naturales	64
10.5.1. Plantas bioactivas.....	64
11. Plantas con propiedades antihelmínticas: plantas bioactivas o nutraceuticas.....	66
11.1. Empleo de plantas ricas en metabolitos secundarios	66
11.2. Mecanismos de acción de las plantas ricas en metabolitos secundarios	67
12. Metabolitos secundarios: estructura, biosíntesis y propiedades generales	68
12.1. Estructura química de los compuestos fenólicos.....	68
12.2. Biosíntesis.....	68
12.2.1. Ácidos fenólicos	69
12.2.2. Flavonoides	70
13. Flavonoides: estructura química, propiedades y clasificación.....	71
13.1. Estructura química.....	71
13.2. Propiedades y clasificación	72
14. Taninos.....	74
14.1. Clasificación.....	74
14.1.1. Taninos hidrolizables (THs)	74
14.1.2. Taninos condensados (TCs) o proantocianidinas.....	75
14.2. Estructura química de los taninos condensados.....	75
14.2.1. Enlaces interflavánicos	76
14.3. Tipos de taninos condensados.....	76
14.4. Propiedades generales de los taninos.....	78
14.4.1. Propiedades físico químicas.....	78
14.4.2. Propiedades biológicas.....	79
14.4.3. Propiedades antioxidantes	79
14.4.4. Propiedades antisépticas.....	79
14.5. Distribución de los taninos en la naturaleza	79
14.6. Distribución y localización de los taninos en los vegetales	80
15. Efectos de los taninos sobre los rumiantes	81
15.1. Efectos dependientes de la dosis.....	81
15.2. Efectos negativos de los Taninos condensados	82
15.2.1. Reducción ingesta voluntaria.....	82
15.2.2. Efectos en la fisiología digestiva.....	82
15.3. Adaptaciones de los herbívoros a la toxicidad o baja palatabilidad	83
15.4. Efectos beneficiosos	84
15.4.1. Efectos nutricionales: sobre la digestión de los alimentos y la nutrición animal	84
15.4.2. Efectos sobre la salud: prevención del meteorismo	85

16. Efectos antihelmínticos de los taninos condensados	86
16.1. Ensayos <i>in vitro</i>	86
16.2. Ensayos <i>in vivo</i>.....	87
16.3. Factores potenciales implicados.....	88
16.3.1. Dependientes de la especie parasítica y su localización anatómica	88
16.3.2. Dependientes de la etapa del ciclo biológico de los NGIs	88
16.3.3. Dependientes del hospedador	89
16.3.4. Dependientes de la especie vegetal y/o recursos taniníferos empleados	90
16.4. Posibles mecanismos de acción	91
16.4.1. Efectos directos	91
16.4.2. Efectos indirectos	91
17. Plantas y recursos taniníferos testados.....	93
17.1. Familia Leguminosae.....	93
17.1.1. De climas templados	93
▪ Esparceta (<i>Onobrychis viciifolia</i> Scop.).....	93
▪ Algarrobo (<i>Ceratonia siliqua</i> L. Sp.)	94
17.1.2. De climas tropicales o subtropicales	95
▪ Tzalam (<i>Lysiloma latisiliquum</i> L. Benth.).....	95
17.2. Fuentes purificadas de taninos	95
▪ Quebracho (<i>Schinopsis</i> spp.)	95
RESULTADOS / RESULTS.....	97
HIPOTESIS Y OBJETIVOS / HYPOTHESIS AND AIMS	99
MATERIAL Y MÉTODOS / MATERIAL AND METHODS	100
CAPITULO 1 / CHAPTER 1: OBSERVING DIRECT EFFECTS ON WORMS.....	101
CAMBIOS ESTRUCTURALES / STRUCTURAL CHANGES:	
ARTICULO 1 / ARTICLE 1: Scanning electron microscopy of <i>Haemonchus contortus</i> exposed to tannin-rich extracts under <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> conditions <i>Experimental Parasitology</i> , 133 (3), pp 281-286. 2013	
.....	103
CAMBIOS FUNCIONALES / FUNCTIONAL CHANGES:	
ARTICULO 2 / ARTICLE 2: <i>Caenorhabditis elegans</i> : a model to study the anthelmintic effects of polyphenols on the fertility of parasitic nematodes? In preparation	111
CAPITULO 2 / CHAPTER 2: OBSERVING EFFECTS UNDER CONTROLLED CONDITIONS.....	125
ARTICULO 3 / ARTICLE 3: Study on the anthelmintic effect of carob pods and sainfoin hay when fed on lambs after experimental trickle infections with <i>Haemonchus contortus</i> and <i>Trichostrongylus colubriformis</i> . <i>Parasite</i> , 21, 71, 1-9, (2014).....	127

ARTICULO 4 / ARTICLE 4: Supplementation of sheep with sainfoin hay or quebracho extract affects differently their population of adult <i>Haemonchus contortus</i> and <i>Trichostrongylus colubriformis</i>	139
ANEXO / ANNEX: ARTICULOS DE DISEMINACION / DISSEMINATION PAPERS	153
ARTICULO 5 / ARTICLE 5: Parasitisme helminthique des ruminants: le paradoxe du pâturage? <i>Le Point Vétérinaire/Parasitologie interne des ruminants</i> , (2012), 30-35.....	155
ARTICULO 6 / ARTICLE 6: Spécificités des risques parasitaires des chèvres au pâturage: conséquences sur les modes de gestion. <i>Fourrages</i> (2012), 212, 319-328.....	163
DISCUSIÓN GENERAL / GENERAL DISCUSSION	175
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	185
REFERENCIAS / BIBLIOGRAPHY	189
LISTADO DE TABLAS, FOTOS Y FIGURAS / LIST OF TABLES, PHOTOS AND FIGURES	219

AGRADECIMIENTOS

ACKNOWLEDGMENTS

Agradecimientos al director de mi tesis, el Dr. Hervé Hoste, de la UMR 1225 INRA/DGER "Interaction Hôte-Agent Pathogène" del Institute National de la Recherche Agronomique, I.N.R.A. Toulouse (Francia). Por sus observaciones, correcciones y consejos en el desarrollo de la parte experimental y de redacción de mi tesis. Este trabajo ha sido financiado por la Unión Europea a partir del proyecto Marie-Curie Research Fellow (Healthy Hay Project) (MRTN_CT-2006-035805), COST CAPARA y Low Input Breed.

A la Dr. Smaragda Sotiraki por acogerme en su laboratorio y por la enorme ayuda prestada en mi trabajo durante y después de mi estancia en el Veterinary Research Institute (VRI) de Tesalónica, (Grecia). A la Dr. Sofia Belibasaki, directora del Veterinary Research Institute (VRI) por su acogida y excelentísimo trato. A todos los colegas con los que tuve el placer de trabajar, Anastasios Saratsis, Ilias Chaligiannis, Nikos Tzanidakis, Theophilos Papadopoulos, Elena Mavridou, Eleni Malama, Elena Pagoni, Paulina Vlachou, Katerina Saratsi, Nelly Kostopoulou y GiwtaLigda. A los doctores y colegas que han participado en el desarrollo del Artículo 3 realizado en Creta y Tesalónica y que se recoge en mi tesis doctoral, así como al resto de investigadores del VRI –Hellenic Agricultural Organization Demeter y a todos sus trabajadores, administrativos y personal de mantenimiento por sus demostraciones de cariño y amistad: *ευχαριστώ παρα πολύ*. Esto no podría haber sido posible sin el soporte financiero de Marie Curie Research Fellow (Healthy Hay Project) y COST-STSM-FA0805 –CAPARA- Project.

Thanks to Dr. Smaragda Sotiraki for my admission in her laboratory, her great help and the friendship she gave me during and after my stage at the Veterinary Research Institute (VRI) (Thessaloniki, Greece). To Dr. Sofia Belibasaki, Director of the Veterinary Research Institute (VRI), for her excellent welcoming. To all the colleagues who I worked with: Anastasios Saratsis, Ilias Chaligiannis, Nikos Tzanidakis, Theophilos Papadopoulos, Elena Mavridou, Eleni Malama, Elena Pagoni, Paulina Vlachou, Katerina Saratsi, Nelly Kostopoulou and Giota Ligda. To the Doctors and colleagues that participate in the experience reported in Article 3 of my PhD, as well as the rest of researchers from VRI –Hellenic Agricultural Organization Demeter and the whole workers, administrative assistances, maintenance personal service, for their affection and friendship: *ευχαριστώ παρα πολύ*. This could not be possible without the financial support of Marie Curie Research Fellow (Healthy Hay Project) and COST-STSM-FA0805 –CAPARA- project.

Al Dr. Eduardo López García, mi tutor académico, profesor titular de la Universidad Autónoma de Madrid, Unidad de Biología, departamento de Zoología, por aceptar ser mi tutor, y por su gran ayuda en la tutela académica, su disponibilidad, colaboración y consejos en este largo proceso

Al resto de doctores del grupo de Investigación en Biología Marina, por su amabilidad a la hora de recibirme y permitirme trabajar en su laboratorio para el análisis de los contenidos abomasales e intestinales Low Input Breed. Al resto de colegas Dr. Lucía Arregui por prestarme su ayuda y materiales cuando los necesitaba. A los Dres. Javier de Miguel Águeda, Raquel Monclús e Isabel Barja por sus muestras de apoyo y sabios consejos.

A Mme. Christine Citti (DR INRA), responsable del equipo "Pathogénèse des infections à mycoplasmes" de l'UMR1225, al Director y Profesor de la Escuela Nacional de Veterinaria de Toulouse

Alain Milon y al Catedrático Vicente Mazimpaka Nibarere, Defensor Universitario de la UAM por su mediación y ayuda en la realización de esta tesis. Al Dr. José Luis Hórreo Escandón del departamento de Ecología Evolutiva del MNCN, por sus revisiones en algunos de los capítulos de la presente tesis. A los Doctores Ismael Galve Roperh (UCM) y Verónica Martínez Cerdeño (UC Davis) por los consejos y correcciones realizados durante la última etapa de esta tesis.

A los miembros del equipo de 'Interaction tanins-nématodes digestifs' con los que he compartido mi experiencia en Toulouse y con los que he trabajado en algunos de los capítulos de mi tesis: Cintli Martínez-Ortiz de Montellano (Artículo 1 y 4), Nadia Ojeda Robertos (Artículo 2), Fotini Manolaraki (Artículo 2, 3, 5 y 6), Erick Azando (Artículo 4), Olivier Desrues, Javier Moreno, Leandro Kataoka, Edgar Franco. Y al inolvidable Eric Pardo por su ayuda cuando la he necesitado, su buen humor y amistad: "*C'est pas ma faute à moi*" (Alizée).

Al profesor Michel Franc y al personal del Departamento de la UMR 1225 INRA/DGER 'Interactions Hôte-Agent Pathogène' Christelle, Françoise y Christiana por su simpatía y amabilidad que han hecho de mis años en la unidad una experiencia agradable.

Al Dr. J.P. Nougayrede, por las facilidades brindadas para la realización de las experiencias con *C. elegans* en su laboratorio. A la labor de Sra. Michèle Boury, técnico de la Unité Mixte de Microbiologie Moléculaire, Institut National de la Recherche Agronomique-Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, por su estrecha colaboración en la elaboración del protocolo de *C. elegans*, por compartir su sabiduría y por contribuir a hacer del laboratorio un lugar agradable para el trabajo. El fruto de ésta colaboración se materializa en el Artículo 2 de la tesis.

A Isabelle Fourquaux, del Centro de Microscopía Electrónica Aplicada a la Biología (CMEAB) de la Universidad Paul Sabatier, por su tiempo y gran dedicación en la realización del trabajo de microscopía electrónica indispensable para la elaboración del Artículo 1.

A Joël Ballet y el personal del centro del INRA de Theix por su amor al trabajo, su humanidad y colaboración en la realización de la experiencia Bio (Low Input Breed). Ha sido un placer trabajar con vosotros y disfrutar de lugares tan hermosos.

Al personal de administración de la ENVT, Marie Perrin, Michèle Serthelon, Laurance Lecomte y Corinne Fabreguette, por los agradables momentos que compartimos juntas, su profesionalidad y su humanidad. *Merci beaucoup*.

A los "animaliers" de la ENVT, por los cuidados diarios a nuestras cabras y ovejas, su disponibilidad y buen humor.

A mis compañeros y doctores del departamento de Ecología de la Facultad de Medio Ambiente, de la UCLM que me acogieron y ayudaron en los momentos que más lo necesité, por su generosidad, sus conocimientos y apoyo, muy especialmente a Blanca Céspedes por sus ánimos diarios, a Gonzalo Zabala, Iván Torres y Ángel Velasco, César Morales, Antonio Parra, Daniel Chamorro, Itziar Rodríguez, Belén Luna y Belén Hinojosa. Mil gracias chicos.

A mi nuevo equipo lleno de mujeres competentes y buenas compañeras, de UC Davis Dra. Verónica Martínez Cerdeño, Jeanelle, Hailee, Nadareh, Angela, Keila y al Dr. Noctor, Praktisha, Skippy y Anna.

A mis padres, Carmen y Carlos por quererme tanto, por enseñarme a luchar, a crecer, a sonreír y a amar. A ti, mi querido padre, que no has podido llegar a ver el final de esta pesadilla ni leer estas líneas, espero que te llevases en tu corazón lo mucho que te quiero y lo mucho que te extraño. Y a ti mamá, te admiro y te quiero con locura y con besos. A mi hermano del alma César, a Ángela y Candela, por ser tan valientes y generosos y por compartir su amor. A Nani, Emilia y Pepe (cuidale), por creer en mi más que yo misma y estar siempre ahí. A Samira, por su aporte de tranquilidad. Gracias a vosotros he podido continuar, sois mis cimientos, sin vosotros, no soy nada, os quiero.

A mi otra familia Toledana Eva, Araceli, Lola, Jesu, Cris G., Estela, Lidiana, Bea, Laurita, María, Sergio, Yoli, Jose, Rober, José Antonio, Inés, Rafa, Diegos, Aurelio, Héctor, Cristi D., seguro que me dejo a alguien.... Cada uno habéis vivido y sufrido esto conmigo de alguna manera más o menos cercana, pese a que para muchos de vosotros, ésto de la Tesis os parece una locura incompresible.

A Marisa y Chechu, Alberto, Vero M.C., Silvia y Nacho, Eduardo (Lalo), Mariana, miembros del colectivo biólogo, por vuestra amistad y apoyo incondicional y por hacerme saber llegar que estáis ahí, cuando lo he necesitado.

A mi familia Toulousana, que me han acompañado a lo largo de este viaje, de cerca, de lejos, pero siempre a mi lado sufriendome cada día. Sin vosotros ¿qué habría hecho yo? Valentina, Fabienne, Montse, Noemí y Sylvain, Elisa, Begoña, Asma, Victoria, Marie, Enrique, Carlos, Carmen, José, Estelle, Louis, Rosa, Mariano, Iratxe, Yoli, Erasmus año I, año II... y tanta y tanta gente que no cabe aquí, por escucharme, comprenderme y siempre apoyarme. Sin vosotros todo esto habría sido más difícil.

A mi familia Griega, que me adoptó e integró como una más en su vida cotidiana, sin conocerme de nada. Por vuestro tiempo, vuestro cariño, vuestra ayuda y vuestras enseñanzas... os estoy muy agradecida: Xaroula y María Karava, Alexis y Meli, Giannis, Eliza y Babis, Dimitris y Baso, Valeria, Stephanos, Dimitra, Fani, Lena, María, Nastia. Gracias a María y Ángelo por invitarme a su gran boda Griega. ¡Viva Kozani y Tricala!

Στην Ελληνική μου οικογένεια, που με υιοθέτησαν και με έβαλαν στην καθημερινή τους ζωή χωρίς να με ξέρουν. Για το χρόνο, την αγάπη, την υποστήριξη και τις διδασκαλίες σας, σας είμαι πολύ ευγνώμων: Χaroula και Μαρία Καραβά, Αλέξης, Μέλι, Γιάννης, Ελίζα και ο Μπάμπης, Δημήτρης, Βάσω, Βαλέρια, Στέφανος, Δήμητρα, Φανή, Λένα, Μαρία y Νάστια. ευχαριστώ τη Μαρία και τον Άγγελο που με κάλεσαν στη Big Fat Greek Wedding Tous. ζήτω η Κοζάνη και Τρικάλα!!!

A mi familia Americana, a los que ya están y a los que están por venir, María y Jimmy, la familia Maldonado por siempre cuidarme como a una más y en particular a Miriam. A mi "hermano" Ismael, Sandra y a Alfonso por apoyarme en momentos duros. A las nuevas adquisiciones: Mariana, Cristina, Sara y Jorge. Thanks to all of you guys.

A mis alumnos de español de la Escuelita y a todas las personitas a las que traté de enseñar, educar y/o divertir, ya casi todos hombres y mujeres, por todo lo que me habéis enseñado de la vida.

A esos "pequeños rumiantes", 29, 14, 13, 9....

Para todos los exiliados sean cuales sean sus motivos.

LISTADO DE PUBLICACIONES / *LIST OF ARTICLES*

PRIMARY ARTICLES

ARROYO-LOPEZ, C., MANOLARAKI, F., SARATSIS, A., SARATSI, K., STEFANAKIS, A., SKAMPARDONIS, V., VOUTZOURAKIS, N., HOSTE, H., SOTIRAKI, S. 2014. Study on the anthelmintic effect of carob pods and sainfoin hay when fed on lambs after experimental trickle infections with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Parasite*, 21, 71, pp. 1-9.

MARTÍNEZ-ORTÍZ DE MONTELLANO, C., **ARROYO-LÓPEZ, C.**, FOURQUAUX, I., TORRES-ACOSTA, J.F.J., SANDOVAL-CASTRO, C.A., HOSTE, H. 2013. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich extracts under *in vivo* and *in vitro* conditions. *Experimental Parasitology*, 133 (3), pp. 281-286.

HOSTE, H., MANOLARAKI, F., BRUNET, S., **ARROYO-LOPEZ, C.**, MARTINEZ-ORTIZ DE MONTELLANO, C., SOTIRAKI, S., TORRES-ACOSTA, J.F.J. 2011. The anthelmintic properties of tannin rich Legume forages: from knowledge to exploitation in farm conditions. *Options méditerranéennes, Serie A*, 99, 295-304.

ARROYO- LOPEZ, C., BOURY, M., NOUGAYREDE, J.P., MANOLARAKI, F., OJEDA ROBERTOS, N. and HOSTE, H. *Caenorhabditis elegans*: a model to study the anthelmintic effects of polyphenols on the fertility of parasitic nematodes? In preparation

MARTÍNEZ-ORTÍZ-DE-MONTELLANO, C., **ARROYO-LÓPEZ, C.**, AZANDO, E.V., SANDOVAL-CASTRO, C.A., TORRES-ACOSTA, J.F.J., HOSTE, H. Effects of sainfoin hay and quebracho on adult population of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: role of the length of distribution and nature of tannins. In preparation

REVIEWS & DISSEMINATION ARTICLES

HOSTE H., MANOLARAKI F., **ARROYO-LOPEZ C.**, TORRES-ACOSTA, J.F.J., SOTIRAKI. S. 2013. Spécificités des risques parasitaires des chèvres au pâturage: conséquences sur les modes de gestion. *Fourrages*, 212, 319-328.

HOSTE, H, **ARROYO LOPEZ C.**, MANOLARAKI F., OJEDA ROBERTOS N., SOTIRAKI S., TORRES-ACOSTA, J.F.J. 2012. Parasitisme helminthique des ruminants: le paradoxe du pâturage ? *Le Point Vétérinaire*, Numéro spécial Parasitisme interne des ruminants 31-35.

COMMUNICATIONS

1. SOTIRAKI, S., **ARROYO-LOPEZ, C.**, MANOLARAKI, F., STEFANAKIS, A., SKAMPARDONIS, V., VOUTZOUARIKIS, N. and HOSTE, H. 2011. Compared effects of two tannin rich resources on the experimental infections of lambs with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* 8th International Symposium on Nutrition of Herbivores. Aberystwyth University, 6th-9th Sept 2011.
2. MARTÍNEZ-ORTÍZ-DE-MONTELLANO, C., **ARROYO-LÓPEZ, C.**, AZANDO, E., TORRES-ACOSTA, J.F.J., SANDOVAL-CASTRO, C.A., HOSTE, H. 2011. Effect of sainfoin or quebracho supplementation against adult *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. 23rd WAAVP conference Buenos-Aires 21-25 August 2011.
3. HOSTE, H., MANOLARAKI, F., **ARROYO-LOPEZ, C.**, FOURQUAUX, I., SOTIRAKI, S., THAMSBORG, S.M., TREUTTER, D., REGOS, I., STICH, K., HALBWIRTH, H., STRINGANO, E., MUELLER-HARVEY, I. 2011 Tanniniferous Legume forages used as nutraceuticals: A novel approach to control parasitic nematodes of the gastrointestinal tract of ruminants. International Conference on Natural Products. Castres 24-27th May 2011.
4. HOSTE, H., MANOLARAKI, F., **ARROYO-LOPEZ, C.**, OJEDA ROBERTOS, N. Traiter les vers par des fourrages? Festival de la Brebis St Afrique 10/12th Sept 2010.
5. HOSTE H., MANOLARAKI F., BRUNET S., **ARROYO LOPEZ C.**, MARTINEZ-ORTIZ DE MONTELLANO C. SOTIRAKI, S., TORRES-ACOSTA, J.F.J. The anthelmintic properties of tannin rich Legume forages: from knowledge to exploitation in farm conditions. 13th meeting of the subnetwork FAO CIHEAM on Nutrition Leon.13 -16th Oct 2009.
6. MARTÍNEZ-ORTÍZ DE MONTELLANO, C., **ARROYO-LOPEZ. C.**, FOURQUAUX, I., SANDOVAL-CASTRO, C.A., TORRES-ACOSTA, J.F.J., HOSTE, H. 2009. Ultrastructural changes provoked by three tannin rich plants to adult *Haemonchus* in *in vitro* and *in vivo* conditions. Thessaloniki meeting 1st COST CAPARA meeting 7-8th October 2009.
7. CHAUVIN, A., MANOLARAKI, F., **ARROYO-LOPEZ, C.**, HOSTE, H. 2009. Risques parasitaires au paturage et sa maîtrise. Journées AFPP 25-26 Mars 2009. Paris.
8. MARTINEZ-ORTIZ DE MONTELLANO, C., **ARROYO-LOPEZ, C.**, FOURQUAUX, I., BRUNET, S., TORRES-ACOSTA, J.F.J., SANDOVAL CASTRO, C.A., HOSTE, H. 2009. Observations by scanning electron microscopy of the changes induced to *Haemonchus contortus* after contact with two tanniniferous plants in *in vitro* and *in vivo* conditions. Société Française de Parasitologie, Poitiers, 17 18 Juin 2009.

9. SOUSA, J.P., SIMÒN, C., DE GAMA, M.M., **ARROYO, C.**, PINTO, C., KEATING, A., IVITIS, E. Landscape metrics ruling Collembola richness and diversity in Mediterranean oak forests.
10. XI International Colloquium on Apterygota. Rouen, (France). 2004.
11. SOUSA, J.P., BOLGER, T., DE GAMA, M.M., LUKKARI, T., PONGE, J-F., SIMÒN, C., TRASER, G., VANBERGEN, A.J., BRENNAN, A., DUBS, F., IVITIS, E., KEATING, A., **ARROYO, C.**, PINTO, C., STOFER, S., WATT, A.D. Changes in Collembola species assemblages along a gradient of land-use intensity: a pan European study - XI International Colloquium on Apterygota. Rouen, France. 2004.
12. SIMÓN, C., ESPANTALEÓN, D., ELIA, E, **ARROYO, C.** Biodiversity variations in the Entomological fauna between Natural and Manipulated forest in the Cabañeros National Park – 6th Seminar on Apterygota. Certosa di Pontignano (Italy). 2002.

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS* / LIST OF ABBREVIATIONS USED

- AHs** Anthelmintics (Antihelmínticos)
- BA** Biological activity (AB: Actividad Biológica)
- BW** Body weight (Peso vivo).
- BWG** Body weight Gain rate (Tasa de ganancia de peso vivo)
- C. siliqua** *Ceratonia siliqua*, Carob (Algarrobo)
- CP** Crude protein (Proteína cruda)
- CT(s)** Condensed tannin(s) (TCs Taninos Condensados)
- VI** Voluntary intake (CV Consumo Voluntario)
- DIC** Differential Interference Contrast microscopy, (Óptica de contraste diferencial u Optica Nomarski)
- DM** Dry matter (intake) (MS Materia Seca)
- DP** Dry plant (Plant Seca)
- EPG** Eggs per gram of faeces (HPG huevos por gramo de heces)
- FECs** Faecal egg counts (conteo fecal de huevos)
- GL** Globule leukocytes (Glóbulo leucocitos)
- GINs** Gastrointestinal Nematodes (NGIs Nemátodos gastrointestinales)
- H. contortus** *Haemonchus contortus*
- HT(s)** Hydrolysable tannin(s) (THs Taninos Hidrolizables)
- KDa** Kilo Dalton
- L3** Infected stage larvae. (Larva estadio 3 desenvainada)
- (L3)** Ensheathed larvae. (Larva estadio 3, envainada)
- LT** Long Term (Largo plazo)
- L. corniculatus** *Lotus corniculatus*
- L. latisiliquum** *Lysiloma latisiliquum*. Tzalam, salám.
- L. pedunculatus** *Lotus pedunculatus*
- M. sativa** *Medicago sativa*. Lucerne (Alfalfa).
- N** Nitrogen (Nitrógeno)
- OM** Organic matter (Materia orgánica)
- PA** Proanthocyanidins (Proantocianidinas)
- PCV** Blood packed cell volume (Volumen del paquete celular)
- PEG** Water-soluble polyethylene glycol (Polietilenglicol)
- MW** Molecular weight (PM Peso Molecular)
- TRP** Tanin Rich Plants (PRT Plantas Ricas en Taninos)
- O. viciifolia** *Onobrychis viciifolia*. Sainfoin (Esparceta, pipirigallo)
- PVPP** Water-insoluble polyvinyl polypyrrolidone (Polivinil pirrolidona insoluble en agua)

T. colubriformis *Trichostrongylus colubriformis*

SEM Scanning Electron Microscopy (MEB, Microscopía electrónica de Barrido)

S. papillosus *Strongyloides papillosus*

ST Short Term (Corto plazo)

TEM Transmission Electron Microscopy (MET, Microscopía electrónica de transmisión)

TPs Total phenols (Fenoles totales)

TTs Total tannins (Taninos totales)

***NOTA:** Las abreviaturas que aquí se recogen corresponden a la versión inglesa de los términos empleados lo largo de los capítulos, a su lado aparece su significado en inglés y su traducción al español entre paréntesis, en algunos casos como aparece su nombre en francés. En el caso de las abreviaturas de la Introducción, redactada en español, éstas se encuentran convenientemente explicadas a lo largo del propio texto.

RESUMEN / ABSTRACT

Las infestaciones producidas por nematodos del tracto gastrointestinal representan una patología importante en las explotaciones pecuarias ovinas y caprinas. Según la F.A.O. la transcendencia de los problemas parasitarios radica en la amenaza para la salud y el bienestar de los rumiantes, suponiendo además, un gran impacto económico en los sistemas de productivos. Durante los últimos 50 años, las medidas de control parasitario se han centrado en la quimioprofilaxis intensiva, con el uso continuado de drogas Antihelmínticas (AHs). Sin embargo, la exclusiva dependencia de las moléculas sintéticas ha dado lugar a múltiples limitaciones. El rápido desarrollo de resistencia a AHs y su difusión a nivel mundial (Jackson y Coop, 2000; Kaplan, 2004; Waller, 2006) indican, que el control parasitario a través de drogas sintéticas es deficitario, además de no sostenible.

Los resultados obtenidos en la última década con plantas bioactivas, revelan que éstas podría representar una opción prometedora en el control de las infestaciones de nemátodos en pequeños rumiantes (Ver revisiones de Githiori et al., 2004, Hoste et al., 2006, Rochfort et al., 2008). Observándose, que el consumo de plantas ricas en taninos (RT) está asociado con alteraciones biológicas severas de las etapas clave (larva infectiva y adulto) del ciclo de vida de los parásitos, en la dinámica de las infecciones y, consecuentemente, en el descenso de los efectos negativos en el hospedador (Hoste et al., 2012).

Aunque los datos que se disponen sobre la población adulta, se ha visto incrementados en los últimos años gracias a recientes tesis defendidas por colegas de nuestro laboratorio, las dificultades en la evaluación de los efectos antihelmínticos nos lleva a plantear el presente trabajo.

En la primera parte de esta memoria se ubica al lector en el marco teórico, describiéndose las características generales de los nemátodos, especies de nemátodos gastrointestinales (NGIs) de interés veterinario o científico (*Caenorhabditis elegans*). Se detallan a continuación, el impacto de las gastroenteritis verminosas en los sistemas productivos ganaderos, los métodos de diagnóstico, así como, los métodos antihelmínticos convencionales y sus limitaciones. A continuación se profundiza en los métodos alternativos, con la descripción de las plantas bioactivas o nutraceuticas y los metabolitos secundarios relacionados con las propiedades antihelmínticas. Ello permitirá al lector, introducirse en el conocimiento de los Taninos Condensados, su estructura química, clasificación, distribución en los vegetales y efectos sobre los rumiantes. Finalmente se hará referencia a las plantas forrajeras y recursos taniníferos empleados en la presente tesis.

En la segunda parte se encuentra el estudio personal realizado organizado en capítulos, que se basa en la comparación de los efectos de las plantas y recursos taniníferos, en la comunidad de parásitos gastrointestinales de los pequeños rumiantes durante la etapa adulta, bajo la hipótesis del efecto directo. Los diversos capítulos se encuentran organizados en varios bloques temáticos: el Capítulo 1, se centra en la observación de los efectos directos en los vermes, tanto a nivel estructural como funcional, en vermes parásitos y en el modelo *C. elegans*, respectivamente. En el Capítulo 2 se

analizan los efectos antihelmínticos en la población adulta dependiendo de la fuente de taninos empleada, evaluándose así mismo, el rol de la concentración y tiempo de exposición a una fuente de taninos. Por último, en el anexo se incluyen dos artículos de revisión sobre los riesgos parasitarios en caprinos, así como la revisión sobre el parasitismo helmíntico y la paradoja del pastoreo.

En la tercera parte se desarrolla la discusión general y síntesis, para cerrar con unas líneas que recogen las conclusiones y perspectivas futuras.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCTION

1. Nemátodos gastrointestinales en pequeños rumiantes

Los nemátodos o nematodos son animales pseudocelomados, no segmentados, con simetría bilateral, de vida libre o parasítica, con morfología similar salvo, adaptaciones al modo de vida parasítica.

1.1. Taxonomía

Pertenecen al Reino: Animalia, Filum: Nematoda y Clase: Secernentea (Anderson, 2000). Dentro del filum existen aproximadamente, 26660 especies catalogadas de las cuales, unas 15970 aproximadamente son especies parásitas (Hiepe et al., 2006) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación sistemática según (Urquhart et al., 1996) y ******(Anderson, 2000). Localización anatómica de los principales vermes parásitos de pequeños rumiantes y hospedadores principales (Waller, 2007).

Orden	Superfamilia	Género	Ejemplo de Especies	Hospedador	Localización Anatómica
Strongylida (Nemátodos Bursados)	Trichostrongyloidea	<i>Haemonchus</i>	<i>H. contortus</i>	Ovinos y caprinos	Abomaso
		<i>Teladorsagia</i>	<i>T. circumcincta</i> <i>T. trifurcata</i>	Ovinos y caprinos	
		<i>Trichostrongylus</i>	<i>T. axei</i>	Bovinos, ovinos, caprinos, equinos y lagomorfos	
			<i>T. colubriformis</i> <i>T. vitrinus</i> <i>T. capricola</i>	Bovinos, ovinos, caprinos y lagomorfos	Intestino Delgado
			<i>Nematodirus</i>	<i>N. battus</i> , <i>N. filicollis</i> , <i>N. spathiger</i> , <i>N. helvetianus</i>	
		<i>Cooperia</i>	<i>C. curticei</i> , <i>C. oncophora</i> , <i>C. punctata</i> , <i>C. pectinata</i>	Bovinos, ovinos y caprinos	
	Strongyloidea**	<i>Oesophagostomum</i>	<i>Oe. columbianum</i> <i>Oe. venulosum</i> <i>Oe. Radiatum</i>	Ovinos y caprinos Bovinos	Intestino Grueso
			<i>Chabertia</i>	<i>C. ovina</i>	
Rhabditida**	Rhabditoidea** (Fam. Strongyloididae)	<i>Strongyloides</i>	<i>S. papillosus</i> <i>S. stercoralis</i>	Múltiples Hospedadores	Intestino Delgado
	Rhabditoidea** (Fam. Rhabditidae)	<i>Caenorhabditis</i>	<i>C. elegans</i>	No parasítica	VIDA LIBRE
Enoplida** (Nemátodos No Bursados)	Trichuroidea	<i>Trichuris</i>	<i>T. ovis</i>	Ovinos y caprinos	Intestino Grueso

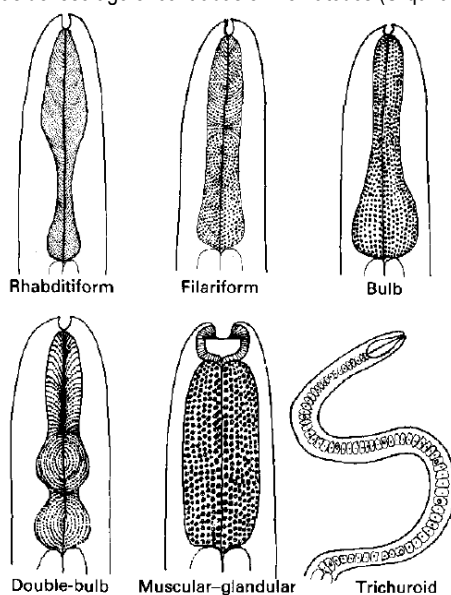
Nos ocuparemos del Orden Strongylida (nemátodos bursados) y del Orden Rhabditida, organizados en superfamilias donde se encuentran las principales especies a las que haremos referencia (Anderson, 2000). Concretamente las fases adultas de los nemátodos gastrointestinales (NGIs) de los Géneros *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, *Nematodirus* y *Cooperia*, dada la repercusión de las gastroenteritis verminosas en los sistemas productivos ganaderos (Johnstone et al., 1998). De igual modo se hace referencia al nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*, por sus posibles aplicaciones en el control parasitario como “parásito modelo” (Holden-Dye and Walker, 2007).

1.2. Caracteres morfológicos generales

Presentan una gruesa cutícula acelular que muda a lo largo de toda la ontogenia, por un proceso denominado Ecdisis (Hiepe et al., 2006). Puede presentar modificaciones en forma de papilas cervicales, caudales, alas caudales o cervicales, vesículas cefálicas y bursa copulatrix (en el caso de los nemátodos bursados). Está sintetizada por la hipodermis subyacente, por donde discurren los canales excretores. El sistema nervioso está constituido por cordones nerviosos que se unen en un anillo nervioso perisofágico. El sistema muscular lo conforman un sistema de células musculares longitudinales situadas entre la hipodermis y la cavidad del cuerpo que permiten un movimiento ondulatorio (Hiepe et al., 2006; Urquhart et al., 1996).

El aparato digestivo es tubular. La boca posee más o menos estructuras especializadas (Ej. cápsula bucal, labios) según los hábitos alimenticios de los vermes. El esófago es uno de los caracteres identificativos de cada grupo (Ej. filariforme (nemátodos bursados), rhabditiforme (fase larvaria preparasítica y algunos nemátodos de vida libre)) (Fig. 1).

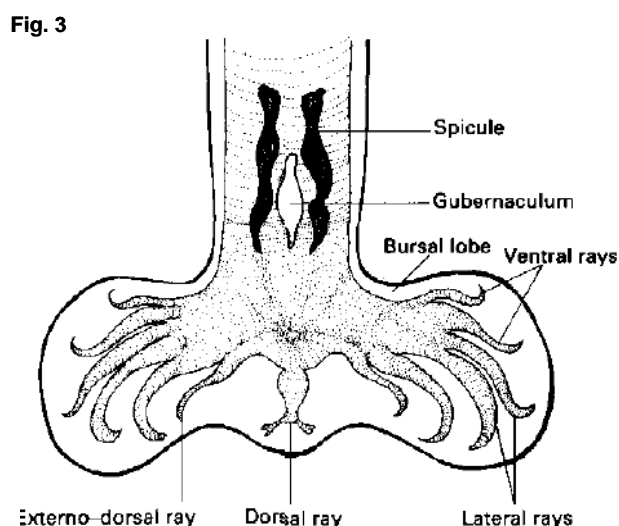
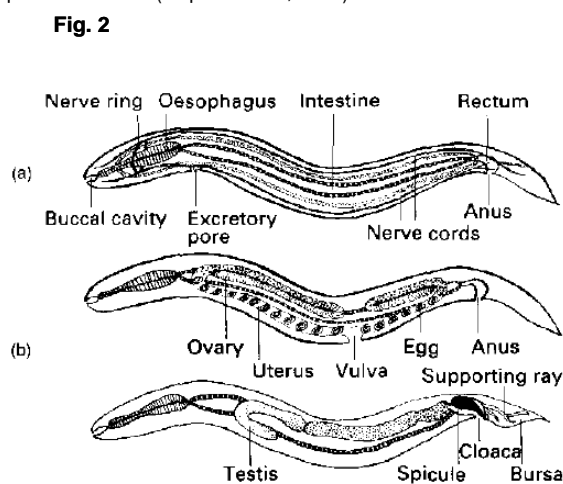
Fig. 1. Formas básicas del esófago encontradas en nemátodos (Urquhart et al., 1996).



El intestino, posee un epitelio sincitial, cubierto de microvellosidades que aumentan la superficie de absorción. Termina en el ano en las hembras y en la cloaca en machos (Urquhart et al., 1996).

Poseen dimorfismo sexual, existiendo especies hermafroditas y otras partenogénicas al menos en algún momento de su ciclo biológico (Ej. *S. papillosus*). Las hembras poseen ovario, oviducto y útero que pueden ser pares. Terminan en una vagina común que se abre en la vulva, pudiendo existir un ovojector que facilita la liberación de huevos (Fig. 2). El pliegue vulvar (Vulval flap) puede estar presente (*H. contortus*) o bien ausente. Generalmente ovíparas, existiendo especies ovovivíparas. El macho presenta un único testículo y vasos deferentes que terminan en el conducto eyaculador en la cloaca. Los órganos accesorios del macho permiten la identificación de las especies (Ej. Bursa copulatrix de *Trichostrongyloides* con espículas y gubernáculo quitinosos) (Urquhart et al., 1996) (Fig. 2 y 3).

Fig. 2. Sección longitudinal a) Sistema nervioso, excretor y digestivo, b) Sistema reproductor hembra (arriba) y macho (abajo). **Fig. 3.** Bursa copulatrix machos. (Urquhart et al., 1996).



1.3. Identificación de nemátodos gastrointestinales

Las identificaciones se realizaron a partir de los individuos adultos, colectados respectivamente del abomaso e intestino delgado tras la necropsia de los hospedadores. Se emplearon tanto la lupa binocular estereoscópica como el microscopio óptico. Cuando fue necesario, se añadieron gotas de lugol, para la tinción y facilitar la identificación (Wood et al., 1995). Se consideraron las características morfológicas específicas, que se citan en el siguiente epígrafe.

2. Orden Strongylida

A continuación se describen Superfamilias, Géneros y especies a los que se hace alusión en la presente tesis.

2.1. Superfamilia Trichostrongyloidea

Adultos filiformes de pequeños tamaño, incluidos en el grupo de los nemátodos bursados, por la presencia de una bursa copuladora en los machos, situada en su extremo posterior (Urquhart et al., 1996) (Fig.3). En general son parásitos del tracto digestivo salvo excepciones. Presentan una cutícula sencilla sin demasiadas protuberancias y una cápsula bucal vestigial. Los machos poseen en la bursa copulatriz dos espículas con caracteres diferenciadores para cada especie. Son responsables del incremento de la mortalidad y de la morbilidad, especialmente de rumiantes. Los nemátodos trichostrongyloides son los más representativos en cuanto a potencial patógeno se refiere (Samuel et al., 2001). Los principales responsables de las nematodiasis gastrointestinales en rumiantes son *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* y *Trichostrongylus* spp. en corderos (Bailey et al., 2009), dentro de los cuales, nos centraremos en: *T. axei*, *T. colubriformis* y *T. vitrinus*. Así mismo se hará referencia a representantes de los géneros *Cooperia* y *Nematodirus*.

2.1.1. Género *Haemonchus*

Es el género más conocido, se localiza en el abomaso de ungulados y es uno de los helmintos más patogénicos en los animales domesticados (Anderson, 2000). De las especies pertenecientes a este género destaca especialmente *Haemonchus contortus*.

- *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803)

H. contortus, es un parásito hematófago, emplazado específicamente en el abomaso de los pequeños rumiantes, cabras y ovejas principalmente, así como en otros rumiantes silvestres, normalmente acompañados de otros *Trichostrongylus*, en infestaciones mixtas (Hiepe et al., 2006). Posee una gran potencial multiplicador liberando cada hembra una media de 5000 a 10000 huevos diarios (Hiepe et al., 2006), con una gran capacidad de resistencia a Antihelmínticos (Foreyt, 2001; Hiepe et al., 2006). Tiene una amplia distribución geográfica, con especial impacto en zonas de climas templados, tropicales y subtropicales.

Son fácilmente distinguibles por su gran tamaño, entre 25 y 35mm las hembras y entre 15 y 20mm los machos (Jacquet, 1997). Poseen un sinlofe bien desarrollado. Destaca la presencia de papilas cervicales y un prominente diente o lanceta en la cápsula bucal (Urquhart et al., 1996). Los machos, presentan la bursa copulatriz típica de Strongylida (Johnstone et al., 1998), con un lóbulo dorsal asimétrico y dos grandes espículas barbudas (Hiepe et al., 2006) que facilitan la cópula. Las hembras poseen ovarios blancos arrollados en espiral alrededor del intestino, rojo por su contenido en sangre, lo que da lugar a un llamativo aspecto (Quiroz Romero, 1999). La morfología vulvar puede variar, coexistiendo dentro de un mismo hospedador hembras que presentan hacia el exterior un pliegue

vulvar, con otras de morfología no lingüiforme (Rahman and Hamid, 2007), con forma de botón o de lengüeta (Hiepe et al., 2006) que controla la salida de los huevos.

2.1.2. Género *Teladorsagia* según (Anderson, 2000)

Se trata de vermes de cuerpo filiforme. La boca es pequeña y el esófago relativamente corto. Poseen papilas cervicales situadas hacia la mitad del esófago, así como papilas prebursales. La bursa copulatrix es más bien pequeña con espículas relativamente cortas y generalmente divididas en tres ramas en la zona distal. El gubernáculo está presente (Lukovich, 1981). En las hembras, la vulva está cubierta por una prolongación cuticular (*T. circumcincta*), ausente en el caso de *T. trifurcata* (Barth, 1991). La cola es relativamente corta y puntiaguda (Lukovich, 1981).

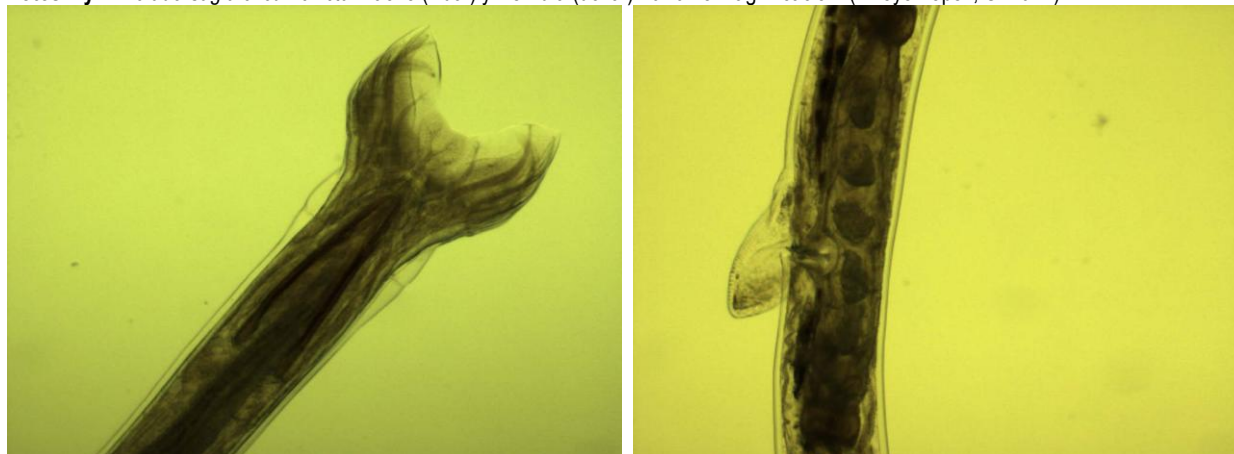
○ *Teladorsagia circumcincta* (Stadelmann, 1894)

Se localiza en el abomaso de ovinos, caprinos, antílopes y algunos otros rumiantes salvajes (Lukovich, 1981). El macho mide de 7 a 9mm (Barth, 1991). En la bursa copulatrix, el rayo dorsal es largo y bifurcado en "V", con cada rama dividida en el último tercio del extremo terminal en dos ramitas desiguales (Lukovich, 1981). Poseen espículas delgadas, divididas en su extremo terminal en tres ramas difíciles de apreciar, dos de ellas terminadas en una punta aguda y la tercera coronada en un proceso hialino. Las hembras miden entre 12,5-13,5mm. La vulva, está cubierta por la prolongación cuticular vulvar. La cola termina en punta (Barth, 1991) (Fotos 1 y 2).

○ *Teladorsagia trifurcata* (Ransom 1907)

Comparten algunos caracteres morfológicos con *T. circumcincta*, pero suelen ser de menor tamaño y el esófago es más corto. El macho mide entre 6,5-7mm (Barth, 1991). En la bursa copulatrix el rayo dorsal está dividido en dos ramas de líneas más abombadas, que asemejan una "U", con los extremos terminales de ambas ramas divididos en varias ramitas. Las espículas son más cortas y robustas que en el caso de *T. circumcincta*. La hembra mide hasta 12mm y carece de prolongación cuticular vulvar (Barth, 1991).

Fotos 1 y 2: *Teladorsagia circumcincta* Macho (izda.) y Hembra (dcha.).10X0.25 Magnificación. (Arroyo López, C. 2011).



2.1.3. Género *Trichostrongylus*

Vermes pequeños, filiformes, de color rojizo-pardo. Parásitos de rumiantes, caballos, cerdos, conejos y aves de corral, algunas especies han sido citadas en humanos asociadas con infecciones zoonóticas (Anderson, 2000). No suelen ser los agentes patógenos principales en las áreas templadas, pero sí ser uno de los componentes de la carga parasítica de las gastroenteritis en rumiantes. Por el contrario, sí resultan importantes en la zona de subtrópico. Se localizan en el intestino delgado, salvo en el caso de *T. axei*, al tratarse de una especie abomasal (Urquhart et al., 1996).

Tanto los huevos embrionados como las larvas infectivas L3, toleran bien las condiciones adversas de frío o calor, con una gran capacidad de supervivencia. La hipobiosis parece confirmarse también en este género como ocurren en otros, lo que desempeña un papel importante en la epidemiología verminosa (Anderson, 2000; Urquhart et al., 1996).

No poseen cápsula bucal, pero sí un característico poro excretor en la región esofágica. El esófago es de gran longitud en relación con el cuerpo. Los machos poseen una bursa copulatriz bien desarrollada, con los lóbulos laterales amplios, mientras el lóbulo dorsal no está bien definido. El rayo dorsal es grácil, con dos ramitas que terminan con cortas bifurcaciones. Las espículas son cortas y robustas, bien quitinizadas, de color pardo, no ramificadas, salvo en el caso de *T. axei* (Urquhart et al., 1996). El gubernáculo está presente. El útero en las hembras es amfidelfo. La vulva se encuentra en la parte posterior del cuerpo. La cola es corta y puntiaguda (Urquhart et al., 1996).

- *Trichostrongylus colubriformis* (Giles, 1852)

T. colubriformis es uno de los causantes más comunes de la gastroenteritis en rumiantes de zonas templadas (Urquhart et al., 1996). Se localiza en el intestino delgado, es quimívoro y se alimenta del contenido intestinal del hospedador. Con un tamaño inferior a 7mm de largo y presentan dificultades para ser visualizados a primera vista. Los machos poseen un lóbulo dorsal reducido y un rayo dorsal corto con las dos ramas laterales truncadas. Las espículas copuladoras están “escalonadas” y el gubernáculo quitinizado aparece curvado (Lukovich, 1981). Las hembras carecen de pliegue vulvar y su extremo terminal es afilado, con una cola corta que termina en punta (Foto 3).

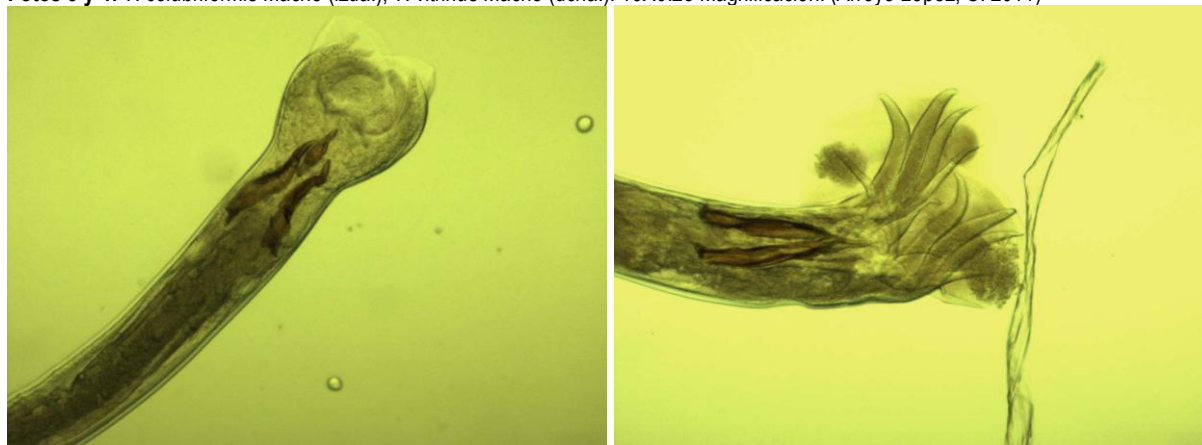
- *Trichostrongylus vitrinus* (Looss, 1905)

Es un parásito cosmopolita del duodeno de corderos, cabras y otros rumiantes, suele aparecer asociado a *T. colubriformis* (Anderson, 2000). Algunos datos sugieren que puede ser una especie dominante sobre el total de la población de *Trichostrongylus* spp., resultando significativo en corderos (Bailey et al., 2009). La bursa copulatriz del macho es algo más grande que la de *T. colubriformis*. El rayo dorsal es medianamente robusto y se bifurca cerca de su terminación. Las espículas tienen igual longitud y son puntiagudas en su extremo. En la hembra, la cola es más larga que en *T. axei* y *T. colubriformis*, algo cóncava ventralmente y terminada en punta (Lukovich, 1981) (Foto 4).

○ *Trichostrongylus axei* (Cobbold, 1879)

Se localiza en el abomaso de rumiantes y en el estómago de caballos y cerdos (Urquhart et al., 1996). Los adultos miden alrededor de 4 a 8mm. *T. axei* posee similares requerimientos para su desarrollo que *T. circumcincta* (Callinan, 1978), por lo que podría estar en desventaja cuando compite con *H. contortus* y *T. circumcincta* (Diez-Baños et al., 1992) para establecerse en el abomaso. La bursa copulatrix de los machos está bien desarrollada. El rayo dorsal relativamente largo y delgado, se divide en dos ramas poco antes de su terminación, subdivididas a su vez cada una en dos ramitas muy cortas, de igual longitud. Las espículas son cortas, robustas con una espina que sobresale lateralmente. Cada una tiene forma y longitud diferentes, siendo la de la derecha más corta que la de la izquierda. El gubernáculo quitinizado está presente. En la hembra, la cola es algo más corta que la de *T. colubriformis* y *T. vitrinus* y termina en punta (Lukovich, 1981).

Fotos 3 y 4: *T. colubriformis* Macho (izda.), *T. vitrinus* Macho (dcha.). 10X0.25 Magnificación. (Arroyo López, C. 2011)



2.1.4. Género *Nematodirus*

Las especies de *Nematodirus*, son parásitos de mamíferos de zonas templadas o frías (Rossi, 1983), lo que explicaría las características de su desarrollo y transmisión (Anderson, 2000). Se localizan en el intestino delgado de los rumiantes, siendo comunes las especies de *N. filicollis*, *N. battus* y *N. spathiger* en corderos y *N. helvetianus* en terneros (Foreyt, 2001).

Son filiformes, caracterizados por una dilatación cuticular cefálica, especialmente en la región bucal que confiere un aspecto de vesícula. Ésta además, presenta estrías transversales. El esófago es corto. En los machos, la bursa copulatrix presenta lóbulos laterales bien desarrollados y un lóbulo dorsal pequeño. Con un set de pares de rayos paralelos en cada lóbulo salvo el caso de *N. battus*, en el que solo están presentes en dos de ellos (Urquhart et al., 1996). El rayo dorsal es doble y termina bidigitado o tridigitado. Las espículas son largas y delgadas, y en su parte distal están unidas por una membrana quitinosa. La unión entre las espículas empieza a una determinada distancia que varía según la especie. Del mismo modo, varía la forma y el largo de la parte terminal. Gubernáculo ausente.

Las hembras poseen la parte anterior del cuerpo más delgada de la posterior. La vulva se sitúa en la tercera o cuarta parte posterior del cuerpo. La morfología de la cola varía según la especie, pudiendo

ser truncada, con un corto apéndice filiforme (*N. filicollis*) o bien alargada como en *N. battus* (Lukovich, 1981; Urquhart et al., 1996).

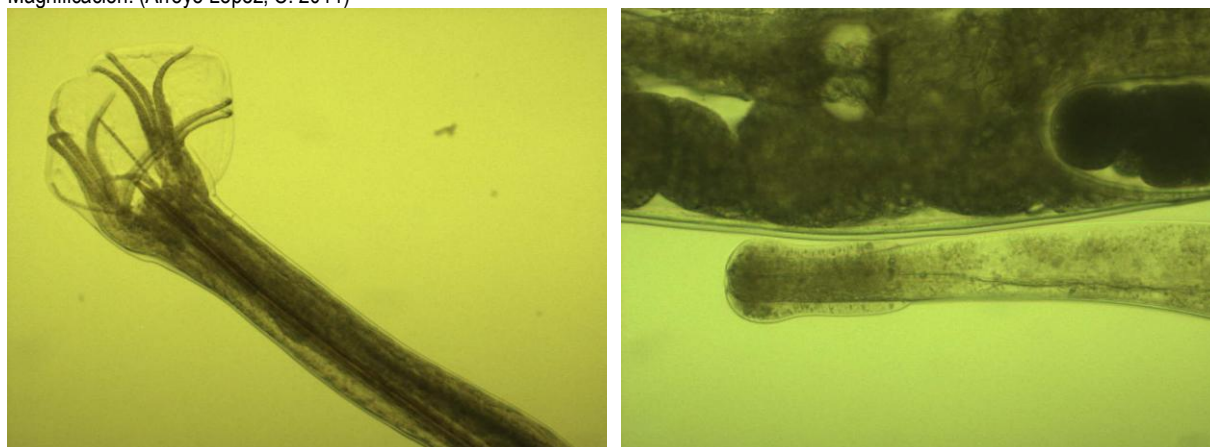
- *Nematodirus battus* (Crofton y Thomas 1951)

Parasita ovejas, cabras y terneros, y suele aparecer junto con otros miembros del mismo género (Anderson, 2000). La dilatación cuticular cefálica está bien desarrollada y en la parte distal, aparece estriada transversalmente. La bursa copulatrix difiere de otros *Nematodirus*, ya que los rayos anterolaterales y mediolaterales no son paralelos. Las espículas son alargadas, con el extremo acorazonado y unido por una membrana (Barth, 1991) y en el extremo proximal presentan abultamientos, confiriéndoles un aspecto de mayor grosor que el cuerpo de las mismas. En las hembras, la cola es corta, en punta cónica y termina con una prolongación marcadamente delgada que sigue disminuyendo de grosor hasta su terminación (Anderson, 2000) (Fotos 5 y 6).

- *Nematodirus filicollis* (Rudolphi 1802)

Parásito cosmopolita de ovejas, cabras, alpacas y varios Cervidae (Anderson, 2000). Presentan una marcada dilatación cuticular cefálica. La bolsa copulatrix del *N. filicollis* es grande con un set de pares de rayos paralelos en cada lóbulo (Barth, 1991). El rayo dorsal es doble y termina trifurcado. Las espículas son largas, delgadas y de estructura tubular, unidas en su parte distal por una membrana quitinosa terminando en forma de lanceta. La parte terminal es larga y con una suave curvatura ventrodorsal que se observa con el verme en posición lateral. En las hembras, el extremo terminal está truncado, con una pequeña y delgada espina en el medio (Lukovich, 1981).

Fotos 5 y 6: *N. battus* Macho (izda.) 10X0.25 Magnificación. Detalle dilatación cuticular cefálica *Nematodirus* spp. Hembra (dcha.) 10X0.40 Magnificación. (Arroyo López, C. 2011)



2.1.5. Género *Cooperia*

Son parásitos cosmopolitas, presentes en el intestino delgado de rumiantes (Anderson, 2000). En las regiones templadas, *Cooperia* juega un papel secundario en las gastroenteritis parasíticas asociado a otros tricostrongilos, contribuyendo a la enteritis en las infestaciones mixtas. Mientras que en las regiones tropicales o subtropicales, puede ser responsable de enteritis severas en terneros (Urquhart et al., 1996).

Son vermes de 8mm de longitud aproximadamente. Presentan dilatación cuticular cefálica, circularmente estriada y un corto esófago (Lukovich, 1981). Poseen unas pequeñas papilas cervicales, difíciles de ver. La bursa copulatriz de los machos es muy voluminosa (Urquhart et al., 1996), con dos lóbulos grandes laterales y uno pequeño dorsal. El rayo dorsal, en la mitad de su longitud aproximadamente, se divide en dos ramas adquiriendo estructura de "lira", con una bifurcación en sus extremos (Barth, 1991). Las espículas cortas y robustas, casi siempre terminan en una punta. No presentan gubernáculo. Las hembras tienen en algunas ocasiones un pequeño labio vulvar o dilataciones cuticulares. La cola es alargada (Lukovich, 1981).

- *Cooperia curticei* (Railliet, 1893)

Parásito de corderos, caprinos, cérvidos y muflones (Anderson, 2000), fundamentalmente en las áreas templadas. Suelen ser menos patógenos que otras especies, puesto que se desarrollan en la superficie del epitelio, sin penetración epitelial. Presenta las características morfológicas típicas del género. En el macho el lóbulo dorsal es corto, con las ramas divididas formando una U y en la base de la bifurcación, sale lateralmente una pequeña ramita. Las espículas son cortas y robustas con una prolongación muy destacada hacia la mitad de ellas (Barth, 1991), terminando levemente curvadas con un proceso hialino en el extremo. En la hembra, la vulva es ovalada y situada en posición transversal. La cola es proporcionalmente la más larga del género (Lukovich, 1981).

2.2. Ciclo biológico *Trichostrongyloides* típico

Monoxeno (con un único hospedador), no hay hospedador intermedio. Existe una fase preparásitica (exógena) que ocurre en el pasto y una fase infectiva (endógena) no migratoria, en el interior del hospedador (Urquhart et al., 1996). Durante el ciclo se suceden varias etapas: huevo, 4 fases larvarias (L1, L2, L3 y L4) acompañados al final de cada una de ellas por una muda o ecdisis (Hiepe et al., 2006), una etapa L5 de adulto inmaduro y finalmente, el adulto maduro.

2.2.1. Fase preparásitica o exógena

La mayoría de los tricostrongilos presentan ciclos similares, con un periodo de desarrollo larvario de vida libre. Las hembras adultas liberan los huevos al pasto a través de las heces del hospedador. En condiciones ambientales óptimas de oxígeno, humedad y temperatura, el huevo eclosiona liberándose la larva L1 (Euzéby, 1963; Smith and Sherman, 1994; Urquhart et al., 1996). L1 muda, desprendiéndose de su cutícula anterior y da lugar a la larva L2 y tras otra muda posterior a L3, en una o dos semanas.

La larva 3, es la forma infectante y se denomina L3 envainada o (L3), porque presenta una doble vaina al conservar la cutícula de L2. No puede, por tanto, alimentarse y se nutre a partir de las reservas almacenadas en las etapas larvianas anteriores (Euzéby, 1963; Soulsby, 1982). La finalidad de la vaina, se cree que es la protección frente al sistema inmune del hospedador (Hiepe et al., 2006), así como les confiere resistencia a las condiciones ambientales y climáticas externas (O'Connor et al., 2006), frente agentes químicos o biológicos, bacterianos y fúngicos (Chandrawathani et al., 2004). En el caso de *Nematodirus* spp., los diferentes estadios larvianos hasta la emergencia de (L3) tienen lugar en el interior del huevo liberado al pasto, por lo que el desarrollo es quizás más largo que otros Trichostrongyloides. Esto además, podría conferirles resistencia ante condiciones ambientales adversas y posiblemente, confirmar la necesidad de una exposición prolongada al frío para la emergencia de las larvas (*N. battus*) en la siguiente primavera (Anderson, 2000) (Fig. 4).

2.2.2. Fase parasítica o endógena

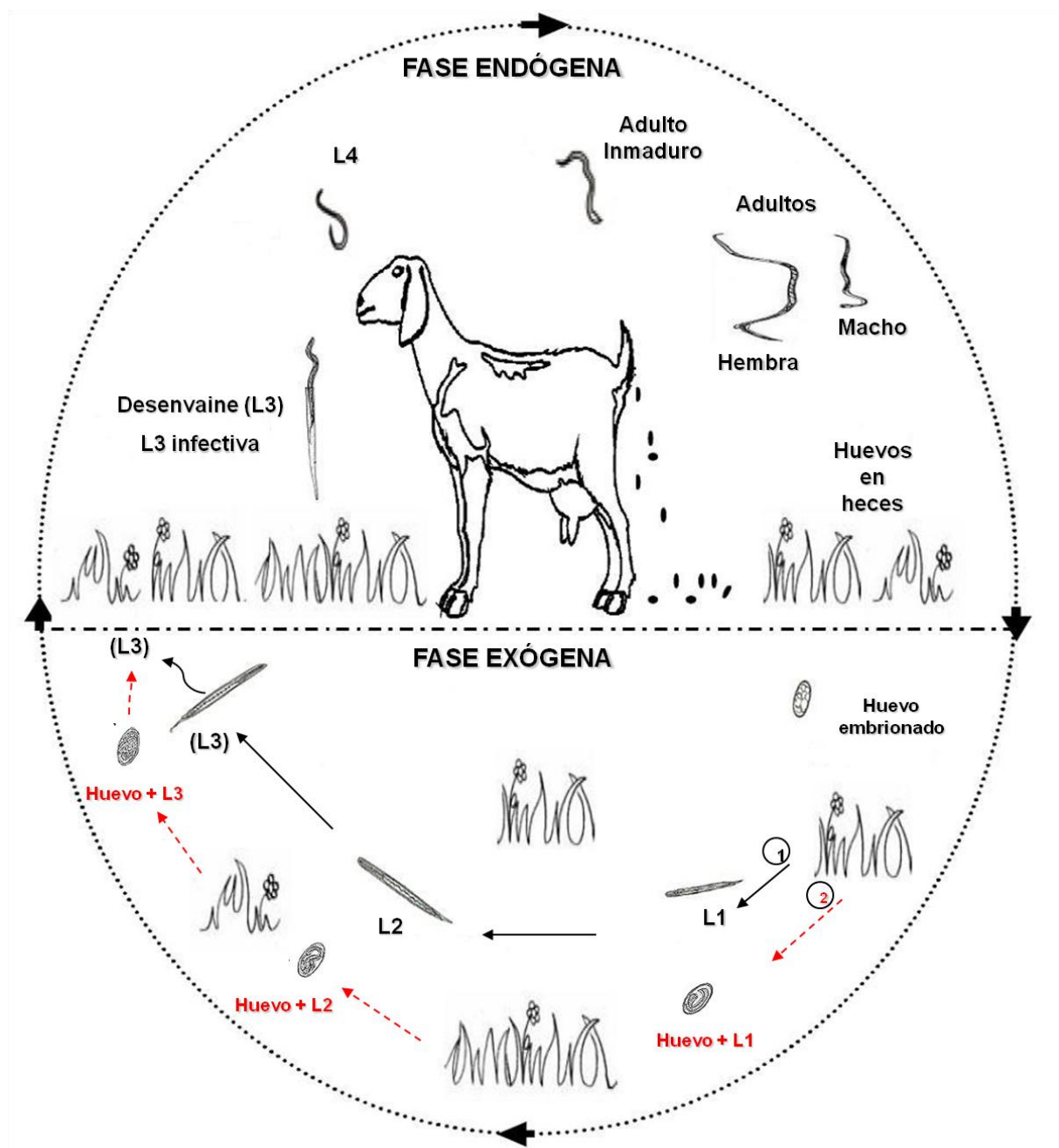
La fase parasítica o endógena es la etapa infectiva. En la mayoría de nematodos trichostrongyloides y strongyloides ésta se produce en el interior del hospedador por la ingestión de larvas en estadio infectante presentes en el medio (L3) (Hiepe et al., 2006). Las (L3s) son muy móviles, se desplazan horizontal y verticalmente siguiendo un higrotropismo positivo (búsqueda de la humedad), un fototropismo negativo (huida de una fuente demasiado fuerte de luz) y un geotropismo negativo (elevación del suelo, en ascenso) (Euzéby, 1963; Rogers and Sommerville, 1963), lo que aumenta las posibilidades de contacto con el hospedador. Ante los estímulos oportunos, (L3) asciende por las hojas húmedas de hierba, donde es ingerida por el hospedador, alcanzando la fase parasítica (Rossanigo and Gruner, 1996).

A través de un proceso denominado desenvaine, (L3) se libera de la vaina de su etapa larvaria anterior (la vaina de L2), marcando la etapa de transición entre la vida libre y la parasítica (Hertzberg et al., 2002; Sommerville and Rogers, 1987). El desenvaine se produce en el órgano situado inmediatamente antes del órgano blanco de los adultos (Hertzberg et al., 2002), el rumen para las especies abomasales y el abomaso para las intestinales (Rahman and Collins, 1990a; Rogers and Sommerville, 1963). Este fenómeno, responde a diversos estímulos: presión de CO₂, pH o la variación de temperatura que sigue a la ingestión (Rogers and Sommerville, 1963; Rogers and Sommerville, 1968).

Una vez desenvainadas, las L3s, se desplazan hacia el lugar específico para el crecimiento de los adultos (Urquhart et al., 1996). Allí, migrarán a las glándulas gástricas, alcanzando la fase histotropa o bien al lumen (Hiepe et al., 2006). Días más tarde emerge L4, que alcanza la luz del órgano para dar lugar a L5 (preadulto) (Dakkak and Dorchies, 1984). La madurez sexual se alcanza en un periodo de tiempo variable según la especie, que suele ser de 2 a 3 semanas, aunque en el caso de algunos nematodos (*Oesophagostomum* spp.), puede llegar a 6 semanas. Después se producirá la fecundación de las hembras por parte de los machos, liberándose huevos a través de las heces (Euzéby, 1963).

Obsérvese, que las especies del género *Nematodirus*, no penetran en la mucosa, sino que permanecen entre las vellosidades intestinales donde alcanzan la madurez sexual (Quiroz Romero, 1999; Urquhart et al., 1996) (Fig. 4).

Fig. 4. Ciclo biológico *Trichostrongyloides*: Mitad superior: Etapa endógena (en el interior del hospedador). Mitad inferior: Etapa exógena (en los pastos). 1) Coloreado en negro, *Trichostrongyloides* típico. 2) Coloreado en rojo, *Nematodirus* spp.



2.2.3. Periodo prepatente

Tiempo que transcurre desde la infestación hasta que las hembras adultas comienzan a liberar huevos. Es variable dependiendo de la especie, la importancia de la infestación y la inmunidad del propio hospedador, aunque suele ser entre 15 y 20 días. Sin embargo, algunos géneros pueden detener su desarrollo y alargar el periodo prepatente (Urquhart et al., 1996) en un fenómeno conocido como hipobiosis.

2.2.4. Hipobiosis

Es característico en periodos invernales en zonas templadas o durante un largo periodo de sequía en las zonas tropicales (Jacquiet et al., 1995). Ha sido citado en los géneros *Ostertagia*, *Teladorsagia*, *Haemonchus* y *Trichostrongylus* (Urquhart et al., 1996, Anderson, 2000). Supone la interrupción del desarrollo larvario.

Ante determinados estímulos, las larvas se enquistan en la mucosa entrando en hipobiosis, un estado persistente de metabolismo reducido, que retrasa su desarrollo y permite la supervivencia en el hospedador durante largos periodos de tiempo (Anderson, 2000). Pese a que los factores que contribuyen a interrumpir el estado de hipobiosis no están del todo claros, se cree que éste se prolongará en el tiempo hasta que los estímulos ambientales (Euzéby, 1963; Smith and Sherman, 1994; Chartier et al., 2000), como hormonas de gestación, variaciones inmunológicas y otros factores, influyan positivamente en la reactivación de las larvas inhibidas (Hiepe et al., 2006).

3. Orden Rhabditida

El orden Rhabditida, incluye numerosos nematodos saprófitos edáficos, que se alimentan de bacterias, siendo componentes importantes de los suelos ricos en materia orgánica en descomposición. Aparentemente, algunos de los miembros primitivos dieron lugar a los cuatro órdenes de parásitos en vertebrados: Strongylida, Oxyurida, Ascaridida y Spirudida (Anderson, 2000).

3.1. Superfamilia Rhabditoidea

Se trata de un primitivo grupo de nematodos mayoritariamente de vida libre o parásitos de vertebrados inferiores o invertebrados. Existen un numero bastante reducido de géneros de vida libre, que pueden provocan problemas en los animales (*Micronema*, *Rhabditis*). Desde el punto de vista veterinario, el género más importante es *Strongyloides*, que, a pesar de no tener significancia patogénica puede derivar en enteritis severa (Urquhart et al., 1996, Anderson, 2000). En las siguientes líneas nos ocuparemos de *Caenorhabditis elegans*, puesto que aparece incluido dentro de la parte experimental desarrollada, como modelo alternativo para el test de antihelmínticos (Geary and Thompson, 2001).

3.1.1. Género *Caenorhabditis*

- *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) Dougherty, 1955

C. elegans es un nematodo bacterívoro de vida libre. Incluidos en su filo encontramos multitud de representantes parásitos, por lo que se cree que los nemátodos parásitos partirían de un ancestro común de vida libre.

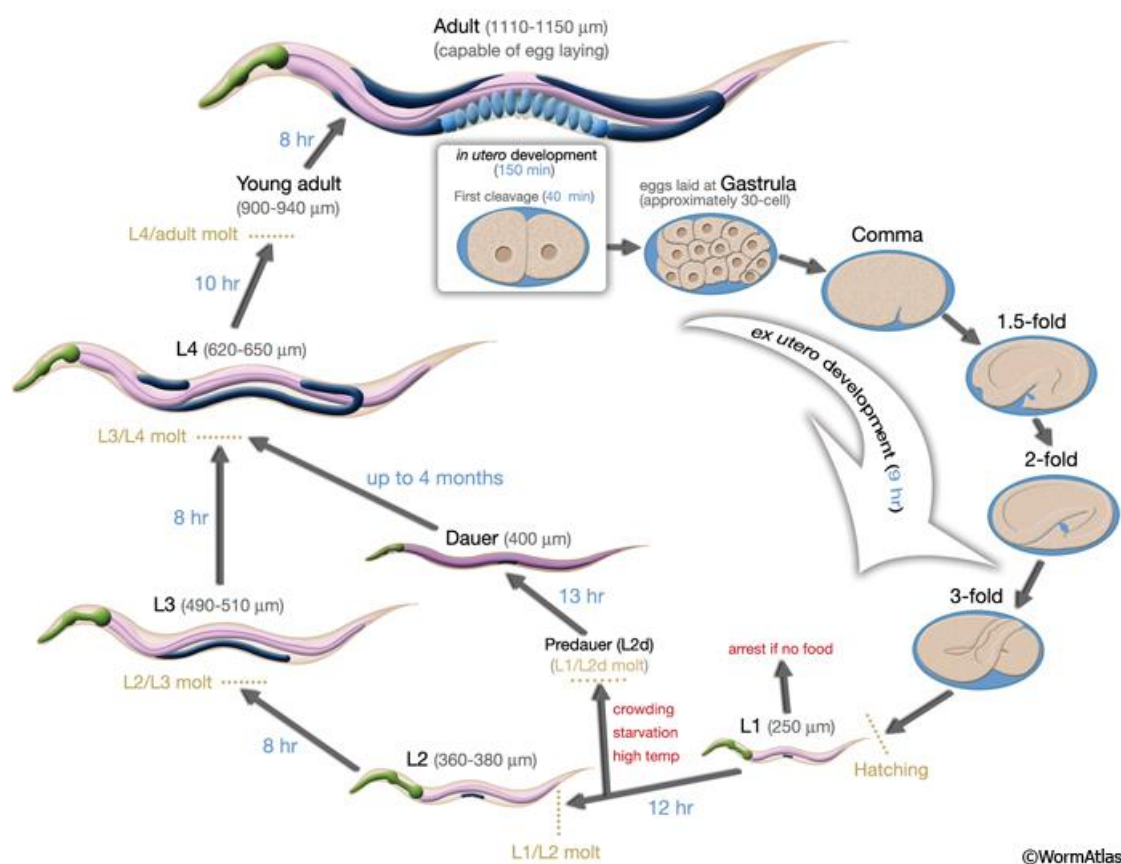
Comparte ciertas similitudes con el nematodo *Diploidasterida* y con los parásitos de vertebrados del orden Strongylida (Bürglin et al., 1998) en la estructura general y la organización de las generación de hembras de vida libre de *Strongyloides* y los hermafroditas de *C. elegans* y, las analogías entre la L3 infectiva y la larva dauer de *C. elegans* (Hotez et al., 1993). Por este motivo, el empleo de este nematodo para el estudio del parasitismo se debe a dos aspectos fundamentales: la larva dauer y la estructura de su cutícula, de especial importancia para los parasitólogos (Bürglin et al., 1998).

3.2. Ciclo biológico *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans N2, es considerado como el tipo "salvaje", es comúnmente empleado en investigación, y del que puede obtenerse una gran progenie a partir de un único hermafrodita (Chen et al., 2006). Poseen un rápido ciclo biológico, más rápido inclusive que *Drosophila melanogaster* (10 días), compuesto por una fase embrionaria que se produce en el huevo. Estadío larvario con larvas de L1 a L4, un joven adulto y finalmente el adulto hermafrodita capaz de liberar huevos (Russell and Cassada, 1975). Los adultos, son vermes de pequeño tamaño, con 1mm de longitud aproximada y 70 µm de diámetro. Generalmente son hembras hermafroditas que presentan simultáneamente esperma y huevos, liberando cientos de descendientes por hembra. Aunque no es frecuente, es posible encontrar machos, si bien en un pequeño porcentaje (0.1- 0.2% de los casos). Sin embargo, es posible obtener machos, cruzándolos con los hermafroditas, donde, cruces simples dan lugar a 50% de machos y 50%

de hembras (Araiz et al., 2008). Normalmente, a partir de una única hembra partenogenética, en una semana puede obtenerse una progenie de 300-350 descendientes y, alrededor de 1000 para hermafroditas de fecundación cruzada (Bürglin et al., 1998) en condiciones de laboratorio.

Fig. 5. Ciclo Biológico de *C. elegans* a 22°C. (Altun et al., 2012)



En la ontogenia de *C. elegans* se suceden cuatro estadios larvarios desde la emergencia del huevo. El ciclo (de cigoto a cigoto) suele completarse en tres días, en un medio de cultivo con *E. coli* OP50, bacteria mutante uracilo dependiente (Stiernagle, 2006; Araiz et al., 2008). La embriogénesis tiene lugar en 14 horas aproximadamente tras la salida del huevo y las cuatro ecdisis que dan lugar a las larvas de L1 a L4, ocurren aproximadamente cada 7 u 11 horas a 25°C (Fig. 5). El efecto de la temperatura de mantenimiento, acelera o bien ralentiza estas etapas, así como la esperanza de vida. Siendo por ejemplo, la esperanza de vida de 15 a 17 días a 20° C (Bürglin et al., 1998), que suele ser la temperatura más frecuentemente utilizada. Así mismo, la velocidad de crecimiento varía dependiendo de la temperatura (Tabla 2), siendo a 25°C, 2,1 veces más rápida que a 16°C. A 20°C, la velocidad es 1,3 veces mayor que a 16°C (Maniatis et al., 1982).

Tabla 2. Desarrollo de *C. elegans* a diferentes temperaturas de crecimiento (Altun and Hall, 2009) (Basado en (Byerly et al., 1976)):

DEVELOPMENT AT DIFFERENT TEMPERATURES			
	"16°C" (16.0 ± 0.3°C)	"20°C" (19.5 ± 0.5°C)	"25°C" (25.0 ± 0.2°C)
Egg laid	0 hr	0 hr	0 hr
Egg hatches	16-18 hr	10-12 hr	8-9 hr
First-molt lethargus	36.5 hr	26 hr	18.0 hr
Second-molt lethargus	48 hr	34.5 hr	25.5 hr
Third-molt lethargus	60.0 hr	43.5 hr	31 hr
Fourth-molt lethargus	75 hr	56 hr	39 hr
Egg-laying begins	~90 hr	~65 hr	~47 hr
Egg-laying maximal	~140 hr	~96 hr	~62 hr
Egg-laying ends	~180 hr	~128 hr	~88 hr
Length at first molt	360 µm	370 µm	380 µm
Length at second molt	490 µm	480 µm	510 µm
Length at third molt	650 µm	640 µm	620 µm
Length at fourth molt	900 µm	850 µm	940 µm
Length at egg- laying onset	1150 µm	1060 µm	1110 µm
Maximal egg- laying rate	5.4/hr	9.1/hr	8.1/hr
Total eggs laid	275	280	170

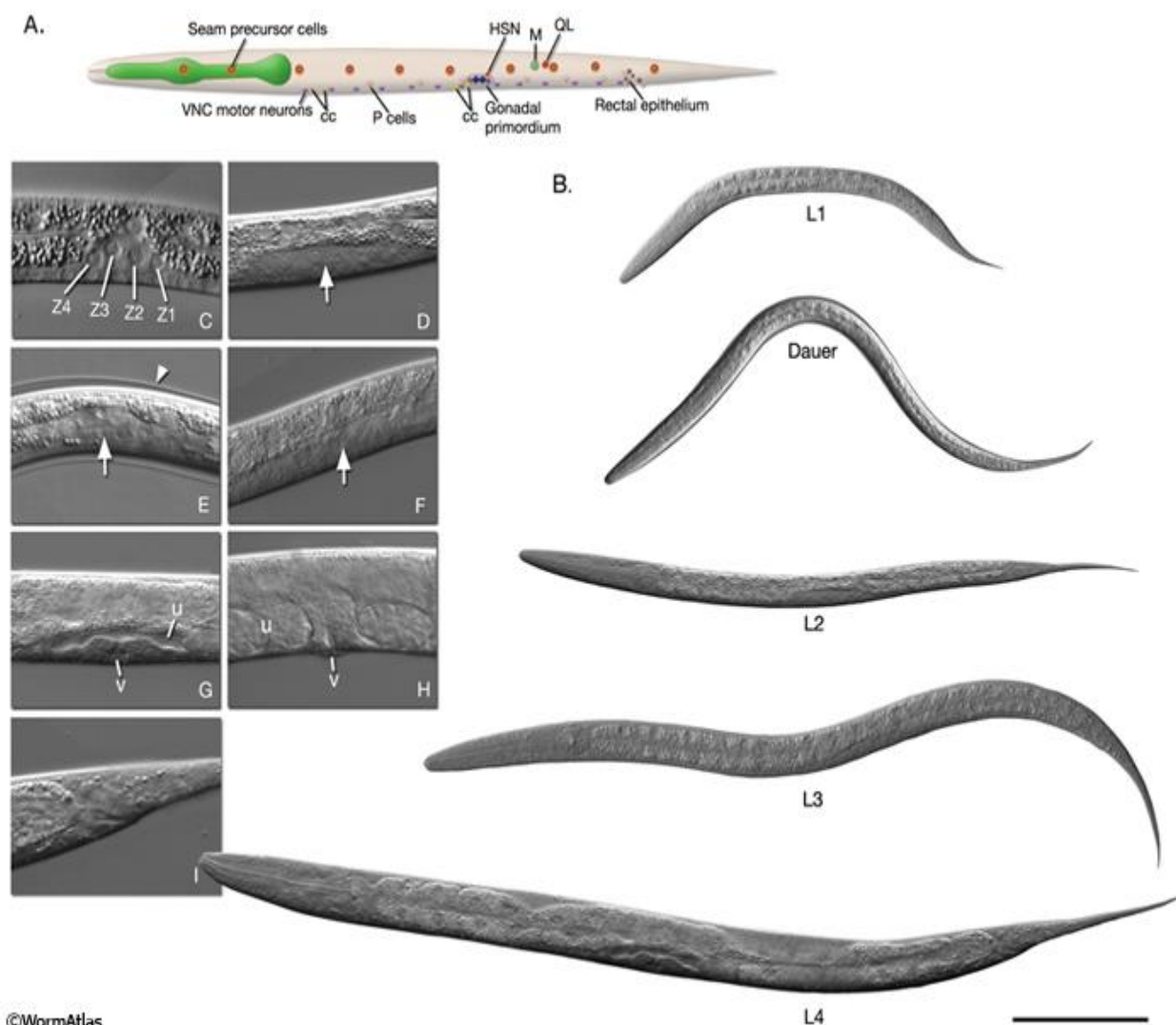
3.2.1. Larva dauer

En condiciones ambientales desfavorables, *C. elegans* detiene su desarrollo, alcanzando el estado de larva dauer. A partir de L1, se llega a L2d y de ahí a Dauer (Fig. 6), estado de latencia en que pueden mantenerse las poblaciones durante un largo periodo de tiempo (Bürglin et al., 1998). La larva Dauer, es una L3 modificada que no se alimenta debido a que presenta la boca y el ano sellados. El esófago está constreñido, es de tipo filariforme y ocupa aproximadamente la mitad de la longitud del cuerpo (Viney and Lok, 2007). Su resistencia metabólica reside en las reservas almacenadas y en un metabolismo reducido (Burnell et al., 2005). Cuando las condiciones son óptimas, la larva Dauer muda a L4 continuando su desarrollo hasta la etapa adulta. El desencadenante, se cree está controlado por una feromona secretada por los propios vermes, donde, efectos como la densidad de población y disponibilidad de alimento, serían algunos de los condicionantes en la modulación de la respuesta.

3.3. Identificación de las etapas del ciclo biológico *C. elegans*

Para la identificación de los adultos grávidos en las experiencias realizadas con *C. elegans* recogidas en la parte experimental, se siguieron los criterios de identificación propuestos por WormAtlas, respecto al desarrollo del útero y presencia de huevos fertilizados, considerando la influencia del factor tiempo y temperatura ambiental en la ontogenia del verme (Fig. 6).

Fig. 6. Etapas del desarrollo larvario de *Caenorhabditis elegans*.



©WormAtlas

Leyenda: **A.** Larva L1 (Arriba derecha). Par ventral anterior de celomocitos (cc) y célula M localizada a la derecha. Células epiteliales rectales situadas en el plano medio, y neuronas motoras (VNC) en línea media ventral, que son más numerosas que las aquí expuestas. (HSN) Neurona Hermafrodita específica. **B. (Derecha)** Imágenes por Óptica de contraste diferencial o DIC de cada estadio larvario. Barra 0.1 mm. **C- H.** (Abajo Izquierda): Imágenes DIC agrandadas de las gónadas de L1 a estado adulto respectivamente. Las tallas no están a escala. Las flechas marcan las gónadas en las imágenes, D-F. (v) Vulva; (u) útero. **C.** L1: cuatro células primordio de las gónadas. **D.** L2: Incremento del número de células germinales. **E.** Dauer: Gónadas de aspecto similar al estadio temprano de L2. La punta de flecha en E, marca la cutícula específica de dauer. **F.** L3: La gónada se extiende a lo largo del cuerpo ventral. **G.** L4: Estructuras somáticas Hermafroditas. **H.** Adulto: La vulva se abre hacia el exterior y el útero está lleno de huevos fertilizados. **I.** Cola L4: Imagen DIC de la cola de L4, que mantiene la morfología en el hermafrodita (Adaptado y Traducido de WormAtlas)

4. Gastroenteritis verminosas en los rumiantes

En términos generales, las parasitosis gastrointestinales representan un importante proceso patológico en pequeños rumiantes (Gray, 1991), que provoca importantes pérdidas económicas en los sistemas productivos ganaderos (Holmes, 1993; Perry and Randolph, 1999). No obstante, es preciso destacar, que el daño producido por las diferentes especies de tricostrongilos depende de multitud de factores relativos al parásito, al hospedador (Quiroz Romero, 1999) y al medio, así como las interacciones que se establecen entre sí (Roeber et al., 2013):

- *Relativos al parásitos:*

Especie, tipo de alimentación (hematófaga o quimívora), productos de excreción-secreción, carga parasitaria, estado evolutivo (larva en lumen o tisular en desarrollo, larva hipobiótica o en estado adulto), y tipo de infestación: mixta o monoespecífica (Roeber et al., 2013).

- *Relativos al huésped:*

Especie, sexo, edad, condición general, estado nutritivo, reproductivo e inmunológico, respuesta inmunitaria frente a la infección, época del año, carga parasitaria, si se trata de una primera infestación o reinfección, etc. (Roeber et al., 2013).

- *Relativos al medio:*

Condiciones climáticas, estación del año, tipo de vegetación, microclima (Roeber et al., 2013) y manejo de los pastos, entre otros.

5. Impactos en la producción

Las estrongilosis digestivas entrañan riesgos en la producción. Los efectos de la infección evolucionan partiendo de consecuencias zoonóticas de carácter subclínico que, a continuación se materializan en signos clínicos, pudiendo finalmente, tener efectos mortales para el hospedador en los casos de una no adecuada intervención.

5.1. Signos clínicos

La evolución de las estrongilosis digestivas es de forma crónica con expresión subclínica (Dimander et al., 2003), que progresivamente mostrará signos clínicos. Los síntomas generales aparecen en forma de un descenso del apetito, pérdida de peso y signos de malnutrición (Urquhart et al., 1996), acompañados frecuentemente por diarreas agudas (Rahman and Collins, 1990b). Generalmente, los signos clínicos de los NGIs del abomaso o del intestino comparten caracteres comunes (Parkins and Holmes, 1989). Aquellos signos más específicos, pueden constatare en función de los nemátodos implicados (Urquhart et al., 1996; Brugère-Picoux, 2004) o de la naturaleza de las infestaciones (monoespecíficas o de carácter mixto) (Parkins and Holmes, 1989). En el caso de fuertes infestaciones, éstas pueden conducir incluso a la muerte de los hospedadores más sensibles.

5.1.1. Abomaso

Las consecuencias clínicas de la parasitosis abomasal en general, están ligadas a la inapetencia, pérdida de peso, diarrea e incremento de los niveles de pepsinógeno en plasma (Parkins and Holmes, 1989). Aunque la pérdida de peso no parece estar exclusivamente asociada a la inapetencia, sino también, a la síntesis de proteínas endógenas a expensas de la masa muscular (Urquhart et al., 1996; Quiroz Romero, 1999). Además, las infestaciones asociadas a especies hematófagas como *H. contortus*, conducen a menudo a una anemia hemorrágica aguda debida al consumo de sangre por parte del parásito (0.05 ml/día), unida a pérdidas de hierro, aminoácidos esenciales (hipoalbumemia) (Hiepe et al., 2006) y proteínas a través del tracto gastrointestinal. Esto, unido a la inapetencia del hospedador, puede dar lugar a la muerte del animal por gastritis hemorrágica (Urquhart et al., 1996; Hiepe et al., 2006). En general, pueden observarse palidez de las mucosas (Hiepe et al., 2006), anemia hemorrágica aguda en corderos, descenso en el paquete de eritrocitos, edema submandibular ("Bottle jaw") (Smith and Sherman, 1994; Urquhart et al., 1996), ascitis, letargia, heces de color oscuro y pérdida de la lana. En las hembras, puede producirse agalactia con la consecuente muerte de los lactantes. Análisis *post mortem* muestran una expansión en la médula ósea roja, desde la epífisis hasta la cavidad medular (Urquhart et al., 1996).

Las especies del género *Teladorsagia* generan en ovinos y caprinos una marcada pérdida de peso, diarrea intermitente y niveles anormales de pepsinógeno en plasma (Urquhart et al., 1996). En el caso de *T. axei*, especie no hematófaga, ésta es responsable de diarreas, deshidratación, edema submaxilar y emaciación en ovinos, caprinos y bovinos (Foreyt, 2001).

5.1.2. Intestino

En las infecciones de *Trichostrongylus* spp., se observa pérdida de peso, diarrea, inapetencia y baja tasa de crecimiento, por lo que a menudo resulta complicado saber si se trata de los efectos de una malnutrición o de una infestación. En el caso de los géneros *Cooperia* y *Nematodirus*, aunque se consideran menos patógenos, su patogenicidad resulta significativa en animales altamente infectados o bien en infestaciones de carácter mixto, al contribuir a la inapetencia y al descenso en la ganancia de peso (Urquhart et al., 1996). Así mismo, *N. battus* incrementa la mortalidad de corderos, siendo responsable de diarreas agudas en animales jóvenes y que pueden resultar fatales (Foreyt, 2001), habiéndose observado en Gran Bretaña como las infestaciones por *Nematodirus* son responsables de una alta mortalidad en corderos (Hoberg, et al., 1986).

5.2. Mecanismos fisiopatológicos

Las alteraciones en la producción y los síntomas observados en los animales parasitados, pueden explicarse debido a las perturbaciones producidas en la fisiología digestiva. Los principales procesos patológicos han sido ampliamente descritos, mientras que los mecanismos patogénicos de los vermes responsables de éstas, aún precisan de una mayor profundización. A continuación se detallan los principales problemas observados a nivel del abomaso e intestino.

5.2.1. Identificación de problemas a nivel abomasal

A nivel del abomaso, se produce la alteración de las glándulas gástricas debido generalmente a la emergencia de las larvas alojadas en su interior. Las células parietales alteradas, son repuestas, pero sin diferenciar, por lo que se produce una variación en los niveles del ácido clorhídrico. Éste fenómeno se extiende rápidamente a otras glándulas, produciéndose un engrosamiento hiperplástico de la mucosa (Quiroz Romero, 1999). A nivel bioquímico, el descenso en la producción de HCl, aumenta el pH de 2 a 7 impidiendo la activación del pepsinógeno a pepsina y la desnaturalización de las proteínas. Se disminuye así mismo, el efecto bacteriostático incrementándose el número de bacterias. Paralelamente, se produce una alteración en la permeabilidad del órgano, probablemente por alteraciones en las uniones celulares de las nuevas células. El resultado es el aumento de niveles de pepsinógeno en sangre, de proteínas plasmáticas en el lumen, con la consecuente hipoalbuminemia (Hoste et al., 1997) y la alteración de los niveles de gastrina (Scott et al., 1998; Simcock et al., 1999) en forma de hipergastremia. También, es común el caso de la diarrea debido al paso del quimo indigesto al intestino, lo que provoca una hipoproteinemia, pérdida osmótica y fallos en la digestión péptica (Quiroz Romero, 1999).

5.2.2. Identificación de problemas a nivel intestinal

En las verminosis Intestinales de *Trichostrongylus* spp., las L3 penetran entre las glándulas epiteliales de la mucosa formando túneles bajo el epitelio por encima de la lámina propia. Cuando las larvas se desarrollan y son liberadas, se produce una importante hemorragia y edema, con la consecuente pérdida de proteínas plasmáticas hacia el lumen intestinal. Se produce una enteritis a nivel

del duodeno, con una alteración de las vellosidades intestinales (Urquhart et al., 1996). Las microvellosidades intestinales se ven alteradas disminuyendo la superficie disponible de absorción de nutrientes y fluidos, además de una hipertrofia e hiperplasia de las glándulas de Lieberkühn en la región en contacto con *T. colubriformis* (Hoste, 1989; Hoste et al., 1988) y una menor diferenciación de los enterocitos (Hoste et al., 1997) asociada con la depleción de la actividad enzimática intestinal. Se originan entonces, alteraciones de la permeabilidad de los epitelios y del peristaltismo, que reducen el tiempo de contacto entre el quimo y la mucosa (Hoste et al., 1997). Las infecciones más graves están asociadas a diarreas y a la pérdida de proteínas plasmáticas a través del intestino, unidas a un descenso de peso. Del mismo modo, se ha observado una reducción en la deposición de proteínas, calcio y fósforo. En el caso de los Géneros *Cooperia* y *Nematodirus*, se considera ejercen una irritación mecánica superficial de la mucosa del duodeno y expoliatriz sobre el contenido intestinal, de forma selectiva (Quiroz Romero, 1999).

5.3. Consecuencias en el hospedador

Los NGIs están relacionados con una pérdida de apetito, alteraciones gastrointestinales, del metabolismo proteico, energético y mineral, cambios en el balance hídrico, así como modificaciones en la composición corporal y de la carcasa de los hospedadores (Fox, 1997). Aunque los mecanismos patogénicos responsables de estas alteraciones no están suficientemente elucidados, la hipótesis de las perturbaciones neurohormonales parece ser clave.

5.3.1. Disminución de la ingestión

Las infestaciones por nemátodos GIs están relacionadas con un aumento del grado de inapetencia (Parkins and Holmes, 1989; Fox, 1997) que puede derivar en una anorexia casi total (Urquhart et al., 1996; Hoste et al., 1997; Kahn et al., 2000; Knox et al., 2006) en los casos más graves. La disminución de la ingesta voluntaria podría ser debida a las alteraciones en los niveles de hormonas gastrointestinales, del tejido adiposo y de algunos neuropéptidos. Una marcada hipergastremia (Fox et al., 2002) y/o elevados niveles de Colecistoquinina (CCK), estarían relacionados con el incremento en la producción de la leptina (Relling et al., 2011). La leptina es una hormona adiposa, con un importante papel en el control del apetito, en el balance energético y en la reproducción (Keisler et al., 1999). Ésta actuaría como estimuladora de la expresión génica del neuropéptido Y (NPY) (Henry et al., 1999) implicado con el control en la homeostasis energética y en la modulación de la ingesta voluntaria (White, 1993; Fox, 1997). Como consecuencia de esto, se produciría la movilización del tejido adiposo como fuente alternativa de energía (Henry et al., 1999) en el hospedador.

5.3.2. Alteraciones gastrointestinales

Además de la pérdida de apetito, las verminosis gastrointestinales parecen estar asociadas con cambios en la motilidad intestinal, posiblemente debidas al aumento en el nivel del gastrina así como a productos de excreción y secreción de los vermes (Simpson, 2000). Igualmente, a lo largo del tubo digestivo, los NGIs son causantes de lesiones epiteliales: modificaciones de las glándulas gástricas y de

la densidad de células diferenciadas a nivel abomasal, la abrasión de las vellosidades y la alteración severa de los enterocitos (Hoste et al., 1997) a nivel intestinal. Estas modificaciones estructurales, tienen repercusión funcional que trae consecuencias sobre la digestión de los alimentos y la absorción de nutrientes (Rahman and Collins, 1991; Hoste et al., 1997; Coop and Kyriazakis, 2001; Knox et al., 2006).

5.3.3. Modificación y reorientación del metabolismo

Debido a los efectos nefastos sobre la digestión de los alimentos, se produce una reorientación metabólica en el hospedador (Hoste et al., 1997). La reducción de la ingestión de nutrientes provoca necesidades nutricionales para mantener la homeostasis sanguínea (en caso de vermes hematófagos) y la integridad de los epitelios, mucosas digestivas y desarrollo de la respuesta inmunitaria (Kyriazakis and Houdijk, 2006). La conjunción de estos fenómenos conduce a la reorientación de las proteínas a los lugares para la reparación, en detrimento de los lugares habituales de síntesis (mamela, folículo piloso y músculo), provocando pérdidas en la producción. Se produce entonces una fuerte perturbación del metabolismo proteico y energético (Fox, 1997; Hoste et al., 1997; Hoste et al., 2005), donde además, según (Knox et al., 2006) el metabolismo del fósforo, calcio y hierro también se verían alterados.

5.4. Déficit zootécnicos

Los impactos en la producción se observan en el retraso en el crecimiento de los animales jóvenes (Urquhart et al., 1996), en corderos (Kyriazakis et al., 1996) o cabritos (Torres-Acosta, 1999). Se aprecian pérdidas de peso y la alteración de la composición corporal (Parkins and Holmes, 1989), con la modificación en la calidad de las carcasas o de la carne (Ej. tasa de grasa reducida, retención de agua) (Sykes and Coop, 1976; Sykes and Coop, 1977). Así mismo, estudios realizados en Australia y Nueva Zelanda parecen confirmar la reducción en la calidad y cantidad de producción de lana (Knox et al., 2006) de los animales parasitados. Respecto a la producción de leche, las tricostrongilosis digestivas han estado frecuentemente asociadas con el descenso en la producción de leche (Hoste and Chartier, 1993; Veneziano et al., 2007) y, aunque de forma menos frecuente, con alteraciones en su composición, observadas sobre todo en aquellas hembras lecheras más productivas (Chartier and Hoste, 1994).

5.5. Mecanismos patogénicos de los vermes

Las perturbaciones fisiopatológicas en el hospedador parecen ser el resultado de los efectos mecánicos de estructuras de fijación parasitarias, efectos abrasivos de la cutícula, así como de los productos de excreción-secreción liberados por NGIs. Aún así, éstas precisan de una mayor profundización.

5.5.1. Efectos mecánicos

Los efectos mecánicos están fundamentalmente asociados a los mecanismos de fijación de los vermes al epitelio, que dañarían los tejidos del hospedador (Hoste et al., 1997), siendo el más característico *H. contortus* por el efecto de la lanceta bucal. En el caso de las especies intestinales tales como *Trichostrongylus* o *Cooperia* spp., sería debido al efecto abrasivo de la cutícula de los vermes sobre los enterocitos (Durette-Desset, 1985; Hoste et al., 1997). Así como el efecto de la emergencia de los vermes al lumen abomasal (Parkins and Holmes, 1989).

5.5.2. Efecto de los productos de excreción y secreción

La mayoría de los nemátodos GIs liberan al medio productos de excreción y secreción (E/S) de naturaleza bioquímica variable: enzimas (proteasas, acetilcolinesterasas) (Mallet and Lesage, 1987; Rogers, 1982; Hoste et al., 1997; Yan et al., 2010), glicoproteínas y/o lípidos propanoides (Yatsuda et al., 2003; Garretson, 2007). La función de los productos de E/S no es del todo conocida, pero se cree que podría intervenir en el proceso de instalación de las L3s, el desarrollo, la nutrición y reproducción de los vermes en el hospedador (Hoste et al., 1995; Huby et al., 1999), así como inducirían alteraciones en el sistema inmune del hospedador, en pro de su propia supervivencia (Simpson, 2000). Algunas moléculas liberadas tendrían un efecto sobre las mucosas del hospedador, contribuyendo a las perturbaciones fisiopatológicas (Hoste et al., 1997) pero también, contribuyendo al equilibrio hospedador-parásito (Huby et al., 1999).

6. Respuesta inmunológica del hospedador y mecanismos de evitación parasitarios

Cada especie de nematodo está adaptada a una región específica del tracto digestivo del hospedador. Dependiendo de su localización y de la intensidad de contacto con la mucosa intestinal se verán expuestos a variedad de respuestas inmunológicas. Aunque el mecanismo por el cual el hospedador resiste a la infección no ha sido del todo elucidado, parece ser que existirían respuestas inmunitarias: innata y adquirida.

La respuesta innata corresponde a la capacidad del hospedador para regular la población de vermes en función de mecanismos de tipo fisiológico no específicos (Ej. movimientos peristálticos, pH gástrico, secreción de mucus) y de tipo inflamatorio (fagocitosis, sistema de complemento y secreción de citoquinas) (Lacroux, 2006).

La respuesta inmune adquirida, se produce como consecuencia de una infestación previa. Es por lo tanto, más tardía pero más específica contra el nematodo en cuestión. En el caso de los ovinos y caprinos, esta respuesta se asocia con la activación de los linfocitos CD4+ T helpers y la polarización de la respuesta hacia TH₂ (respuesta anticuerpo-dependiente) (Saddiqi et al., 2011) con la producción de interleucinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 y IL-13 (Karanu et al., 1997; Saddiqi et al., 2011) y la participación de linfocitos B (Pérez et al., 2001; Pérez et al., 2008). Se produce una mastocitosis tisular, una elevación de la tasa de leucocitos, de eosinófilos sanguíneos y tisulares, mucus y un aumento en la producción de inmunoglobulinas, mayoritariamente de tipo IgA, IgG1 e IgE (Rahman and Collins, 1990b; Balic et al., 2000a; Pérez et al., 2003; Lacroux, 2006).

A pesar de que los mecanismos del hospedador no han sido completamente esclarecidos, parece probable que cada especie de tricostrongilo se enfrenta a respuestas inmunes variables (Saddiqi et al., 2011). Así mismo, se observan diferentes respuestas dependiendo de la fase del ciclo biológico, (Ej. formas adultas y larvarias) de una misma especie (Balic et al., 2000a). Aunque, en general, los efectos sobre la población de vermes podrían resumirse en:

- Freno al desarrollo y establecimiento de las larvas infestantes (Balic et al., 2000a; Balic et al., 2000c; Lacroux et al., 2006).
- La expulsión rápida de los vermes adultos, en la que estarían involucrados mastocitos, glóbulo leucocitos (Huntley et al., 1987) y las células de Goblet de la mucosa (Khan et al., 2001). No obstante, a pesar del incremento de estas poblaciones de células y la magnitud de sus respuestas, los mecanismos inmunológicos aún son de difícil interpretación (Saddiqi et al., 2011).
- Posible retraso en la maduración de los vermes hasta el estado adulto, con cambios en la morfología de los adultos y reducción de la fertilidad de las hembras (Lacroux et al., 2006).

7. Métodos de diagnóstico

Los métodos de diagnóstico empleados en la detección de los NGIs, utilizados a lo largo de las experiencias científicas realizadas, se encuentran convenientemente descritos en cada uno de los artículos que conforman esta tesis. Aún así, se describen en este epígrafe los métodos indirectos y directos especificados.

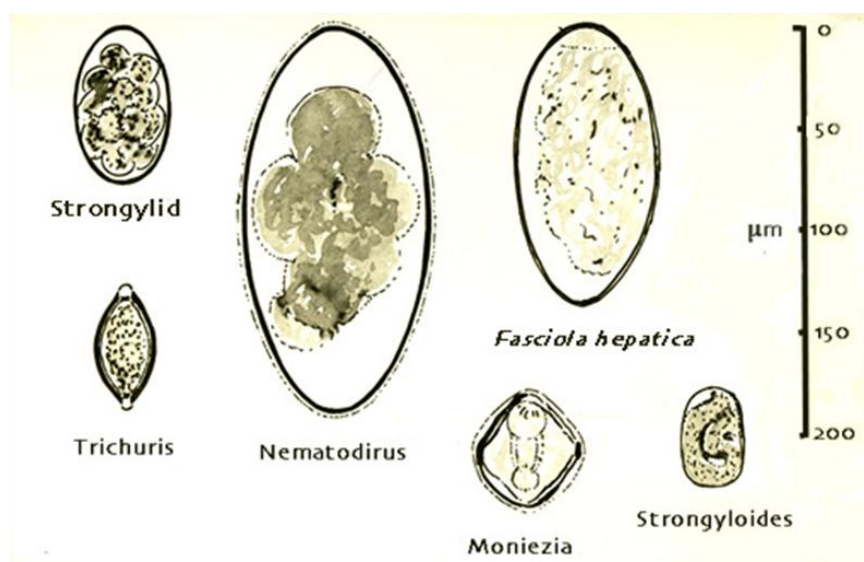
7.1. Métodos indirectos

Los métodos de diagnóstico indirectos, se llevan a cabo mediante la evaluación de los elementos parasitarios *ante mortem*, la valoración de las perturbaciones patofisiológicas provocadas por los vermes en el hospedador y a través de la respuesta del hospedador frente a los vermes.

7.1.1. Evaluación de los elementos parasitarios

El análisis coprológico mediante el método Mc Master modificado (Raynaud, 1970) de las heces frescas, permite determinar la presencia de parásitos y se expresa como huevos por gramo de heces (HPG). Los huevos de los géneros *Teladorsagia*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus* y *Cooperia*, son de pequeño tamaño y suelen encontrarse en estado de mórula con 16–32 células. Son muy similares entre sí y de difícil identificación si no se realiza un coprocultivo, por lo que se clasifican como “Estrongílido típico”. En el caso de *Nematodirus* spp., los huevos destacan por su gran tamaño (Fig. 7). Son ovoides, incoloros o marrones, como en el caso de *N. battus*. Se liberan a través de las heces en estado de mórula conteniendo de 4 a 8 células. Los huevos *Strongyloides* típicos, son mucho más pequeños, aproximadamente la mitad del tamaño del huevo Estrongílido y se liberaran conteniendo en su interior larvas completamente desarrolladas (Anderson, 2000; Urquhart et al., 1996).

Fig. 7. Guía para la identificación de huevos en las heces de pequeños rumiantes. Nematodos gastrointestinales: Strongylidos, Strongyloides, Nematodirus. Cestodos: Moniezia, Trematodos: *Fasciola hepática*.



7.1.2. Evaluación de las perturbaciones patofisiológicas provocadas por los vermes

La evaluación de las perturbaciones patofisiológicas en el hospedador, se realiza mediante el valor hematocrito o Sistema FAMACHA (Van Wyk and Bath, 2002), para vermes hematófagos como *H. contortus*. A través del valor de pepsinógeno sérico, para vermes del abomasum como *Teladorsagia* spp., por el nivel de fosfato inorgánico para vermes del intestino delgado y/o por la evaluación media de la proteinemia o albumemia (Urquhart et al., 1996). También se emplea el índice DISCO (índice de Diarrea) que permite la categorización de la consistencia fecal del hospedador en una escala del 1 al 5 (Pollott et al., 2004). Todos y cada uno de estos métodos aparecen más ampliamente detallados en las experiencias donde fueron empleados.

7.2. Métodos directos

Los métodos directos, se realizan *post mortem* a través de la autopsia de los animales. Permite evaluar la carga parasitaria, la identificación de especies presentes en los diversos órganos del tracto digestivo y la estimación de la fertilidad de las hembras (Wood et al., 1995). Del mismo modo, es posible evaluar la respuesta inmunológica de los hospedadores frente a los vermes.

7.2.1. Evaluación de la carga parasitaria

Se realiza a través del recuento de vermes adultos del abomaso e intestino delgado y con la identificación de las especies recuperadas, presentes en alícuotas que representan el 10% del volumen total colectado (MAFF, 1986). A ello se le unirán aquellas larvas hipobióticas que puedan encontrarse tras la digestión péptica de la mucosa abomasal (Wood et al., 1995). La evaluación de la fertilidad de las hembras precisa de diferentes procedimientos bien conteo directo de huevos en el útero o por el método 10% alícuota, dependiendo de las especies implicadas. Por este motivo, en cada experimento incluido en la presente tesis aparece detallado el método específico empleado.

7.2.2. Respuesta de los hospedadores a los vermes

Se efectúa a través de la medida de la tasa de células efectoras (eosinófilos sanguíneos, mastocitos, glóbulo leucocitos y, células de Goblet) y tasa general de inmunoglobulinas, que se observa en la mucosa digestiva de ovinos (Tzamaloukas et al., 2006; Rios-De Alvarez et al., 2008; Martínez-Ortiz-De-Montellano et al., 2010) o caprinos (Paolini et al., 2003b; Paolini et al., 2003c). Estos han sido y son objeto de investigación como recurso para evaluar la respuesta de los hospedadores a los NGIs.

8. Control farmacológico: métodos antihelmínticos convencionales y sus limitaciones

Los métodos antihelmínticos (AHs) químicos convencionales constituyen un conjunto de drogas sintéticas de amplio espectro, que controlan o inciden sobre multitud de especies parasíticas. La administración repetida los AHs de síntesis permite un tratamiento polivalente que presenta por lo general, alta eficacia, baja toxicidad y una rápida eliminación por parte del hospedador. Son además, de fácil administración y de coste razonable para el ganadero. Se emplean para eliminar nemátodos gastrointestinales del ganado con el objetivo de alterar su ciclo biológico en el interior del hospedador. Actualmente, se conocen varios fármacos incluidos en la familia de los AHs, cada uno con un modo de acción diferente. Sin embargo, aunque tras años de aplicación los AHs de síntesis han mostrado una alta eficacia, el aumento de la frecuencia en los casos de resistencias a AHs induce a pensar que, AHs con modos similares de acción resultarán igualmente ineficaces (Martin, 1997), por este motivo, la búsqueda de nuevas formas alternativas parece ser una solución. A continuación se describen las principales familias de Antihelmínticos y sus modos de acción.

8.1. Clasificación de los antihelmínticos de síntesis

Las drogas antihelmínticas, generalmente afectan al sistema nervioso o bien al metabolismo celular y/o estructura (Samsom-Himmelstjerna, 2007b) de los vermes. Existen varias familias de amplio espectro para el control de las verminosis en rumiantes: los benzimidazoles y pro-benzimidazoles, los imidazotiazoles, las lactonas macrocíclicas y los aminoacetónitril derivados (AAD) como el Monepantel (Tabla 3). Los benzimidazoles y pro-benzimidazoles son eficaces frente a los estróngilos GIs y respiratorios, existiendo algunas moléculas con actividad frente a las duelas. Perteneciente a la familia de las Salicilanidas, el Closantel es una molécula dirigida contra *H. contortus*, *Fasciola hepática* y *Oestrus ovis*, entre otros. Los imidazotiazoles y tetrahidropirimidinas son activos frente a los NGIs y los vermes pulmonares. Las lactonas macrocíclicas poseen actividad frente a los NGIs, pero también frente algunos ectoparásitos (ácaros e insectos) de ahí que se les denominen endectocidas (Urquhart et al., 1996; Smith and Sherman, 1994; Beugnet et al., 1997; Bengone-Ndong and Alvinerie, 2004). A continuación se describen más detalladamente las características y propiedades de éstas familias.

8.1.1. Benzimidazoles (BDZ) y pro-benzimidazoles

En esta familia se encuentran representantes que comparten una estructura química común (Tabla 3). Son de administración oral y se comercializan en forma de solución, “bolus” o incorporados en los complementos mineralo-vitamínicos (Smith and Sherman, 1994). Mientras que los benzimidazoles actúan directamente sobre los vermes, los probenzimidazoles son administrados en forma de pro-drogas, que se convierten en moléculas activas por reacciones enzimáticas que tienen lugar generalmente en el hígado (Lanusse and Prichard, 1993). Son derivados del tiabendazol, por sustitución del anillo bencénico por diferentes moléculas y también se les conoce con el nombre de benzimidazoles sustituidos. Su unión a las subunidades de β -tubulina, provoca la modificación en la polimerización de los microtúbulos (Lacey and Prichard, 1986; Lacey, 1988; Lubega and Prichard, 1991) de las células tegumentarias e intestinales de los nemátodos, sin afectar a la red de microtúbulos del hospedador. Esto

tiene efectos en el transporte celular y la inhibición del metabolismo energético (Martín, 1997) afectando a funciones celulares vitales: división celular (mitosis/ meiosis), transporte celular, absorción de nutrientes, soporte estructural de la célula, etc. Son por lo tanto consideradas toxinas metabólicas (Samsom-Himmelstjerna, 2007b) que conducen a la pérdida de la homeostasis celular y una muerte lenta (Lacey, 1988). Los BZDs, en general, afectan tanto a larvas como adultos y huevos, pero requieren de tratamientos prolongados dado que normalmente tienen muy baja toxicidad y su efectividad depende del tiempo de exposición.

8.1.2. Salicilanilidas

Dentro de la familia de la Salicilanilidas, destaca el Closantel, que posee un amplio espectro de acción con efectos nematocidas, trematocidas y acaricidas. El Closantel induce cambios en la ultraestructura del parásito y trastornos mitocondriales que provocan parálisis y problemas de absorción. Finalmente debido a la alteración de la fosforilación oxidativa, se produce la muerte del parásito (Sumano López and Ocampo Camberos, 2006). Posee una vida media larga, por lo que para la eliminación del Closantel se requieren al menos 15 días, especialmente en el caso de los ovinos (Márquez Lara, 2007).

8.1.3. Imidazotiazoles y tetrahidropirimidinas

A pesar de que los representantes de los imidazotiazoles (Levamisol) y de las tetrahidropirimidinas (Pirantel y Morantel) son compuestos de estructura química diferente (Tabla 3), poseen el mismo modo de acción. Actúan como agonistas de la acetilcolina, fijándose sobre los receptores nicotínicos de las células musculares de los vermes (Martín, 1997; Moreno-Guzman et al., 1998; Samsom-Himmelsjerna, 2007; Samsom-Himmelstjerna, 2007b). Esto provoca la despolarización de la membrana post-sináptica y una contracción muscular rápida y permanente, que desencadena en el nematodo una parálisis espástica (Martín, 1997) y una inhibición de la alimentación por bloqueo de la bomba faríngea (Márquez Lara, 2007). Tienen un efecto rápido sobre larvas y adultos (pero no sobre los huevos) de *H. contortus* y *T. colubriformis*, siendo su efecto menor sobre *T. circumcincta*. El Levamisol, perteneciente al grupo de los imidazotiazoles (Martín, 1997), posee importantes efectos antihelmínticos frente a nemátodos adultos. Algunos tratamientos con imidazotiazoles o pirimidinas exigen días de supresión variables, debido a su permanencia en sangre o tejidos, lo que supone problemas de toxicidad/bioseguridad.

8.1.4. Lactonas macrocíclicas

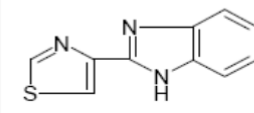
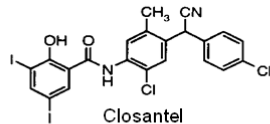
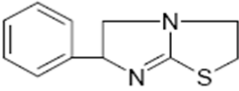
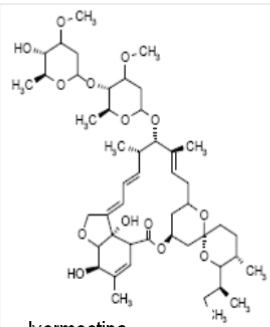
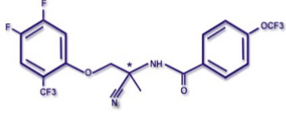
Constituidas por dos grupos de amplio espectro y eficacia frente a nemátodos y artrópodos (insectos y ácaros) (Campbell and Benz, 1984). Esta familia agrupa las avermectinas (AVM) (ivermectina, abamectina, doramectina y eprinomectina) y las milbemicinas (MBM) (moxidectina, selemelectina y milbemicina D) (Beugnet et al., 1997) (Tabla 3). Son moléculas de estructura química compleja, que presenta numerosos heterociclos lactonas. Son sustancias agonistas de la subunidad α de los canales de cloro, de las membranas de las células nerviosas de nemátodos y artrópodos (Cully et

al., 1994; Samsom-Himmelstjerna, 2007b). El efecto es un incremento de la permeabilidad de la membrana a los iones cloro (Urquhart et al., 1996; Beugnet et al., 1997; Bengone-Ndong and Alvinerie, 2004), inhibiéndose el control de las neuronas responsables de los músculos del cuerpo, faringe y útero, lo que provoca la hiperpolarización de la célula muscular originando una parálisis flácida (Samsom-Himmelstjerna, 2007b). El nematodo no puede mantener su posición y es expulsado (Arena et al., 1995) del hospedador. De la misma manera, también, se inhibe la alimentación, con la consecuente disminución de reservas (Geary et al., 1993) y muerte del parásito. La ivermectina, en ovinos, posee gran eficacia y efectividad sobre larvas y adultos, pero posee un alto periodo de permanencia en sangre y tejidos, por lo que es preciso un tiempo de supresión también largo (Gómez Rincón, 2006).

8.1.5. Amino acetonitril derivados: Monepantel

El Monepantel, es un AH perteneciente a la familia de los amino acetonitril-derivados (AAD) recientemente introducido en el mercado y de administración oral (Kaminsky et al., 2008; Sager et al., 2009). Los estudios sugieren que actúa como agonista nicotínico, mediado por un receptor nicotínico acetilcolinesterasa (Kaminsky et al., 2008), sobre las L4 y formas adultas de un amplio espectro de nemátodos. Hasta el momento lo más característico de esta molécula era su actividad frente algunos parásitos resistentes a otras familias de AHs (Hosking et al., 2010; Kaminsky et al., 2011), sin embargo, publicaciones recientes muestran la aparición de resistencias en Nueva Zelanda asociadas al uso de este AH contra al menos las especies de *T. circumcincta* y *T. trichostrongylus* en ovinos y caprinos (Scott et al., 2013).

Tabla 3: Familias de Antihelmínticos, principales moléculas activas con efecto antiparasitario en pequeños rumiantes. Espectro de actividad: Nematodos: SGI: Estróngilos Gastro-Intestinales, SR: Estróngilos respiratorios, Trematodos: *Fasciola hepática*, Cestodos, Ácaros y/o Insectos y blanco esperado en los vermes (Sumano López and Ocampo Camberos, 2006; Kaminsky et al., 2008).

Familias	Representantes	Estructura química de base	Espectro de Actividad	Blanco esperado en los vermes
Benzimidazoles	Tiabendazol Albendazol Fenbendazol Mebendazol Oxfendazol	 Tiabendazol	SGI SGI/SR / <i>F. hepática</i> / Cestodos SGI/ SR / Cestodos SGI/ SR / Cestodos SGI/ SR / Cestodos	β -Tubulina
Pro-benzimidazoles	Febantel Netobimina Tiofanato		SGI/ SR SGI SGI/ SR	
Salicilanilidas	Closantel	 Closantel	SGI Endectocida Fasciolicida Acaricida	Bloqueo fosforilación oxidativa mitocondrial
Imidazotiazoles	Levamisol (Bloqueador tubulina)	 Levamisol	SGI/ SR	Receptores de la Acetilcolina
Tetrahidropirimidinas	Pirantel Morantel		SGI SGI	
Lactonas macrocíclicas	Ivermectina Doramectina Eprinomectina Milbemicinas Moxidectina	 Ivermectina	SGI/ SR Ectoparásitos (Insectos, Ácaros)	Canales iónicos Cloro-Glutamato
Amino-acetonitrilo derivados	Monepantel	 Monepantel	SGI/ SR	Agonista nicotínico

9. Límites a la utilización de los antihelmínticos de síntesis

El empleo de AHs de síntesis frente a los nemátodos GIs presenta una serie de inconvenientes asociados. Uno de ellos, es la presión de los consumidores sobre el bienestar animal y la preocupación por la presencia de residuos en los productos derivados y en el medio ambiente (Waller and Thamsborg, 2004). Así mismo, el uso masivo e indiscriminado de estos fármacos como medida profiláctica, habría contribuido a la aparición y difusión a nivel mundial del fenómeno de resistencia a AHs, en los últimos años. Como consecuencia, la Unión Europea en el marco de sus competencias, establece limitaciones en cuanto al uso de sustancias farmacológicamente activas de uso veterinario, así como aquellas prohibidas en la producción de alimentos de origen animal para consumo humano (Commission Regulation (EU), 22 December 2009). En las siguientes líneas se detallan los principales problemas asociados al empleo de los AHs de síntesis.

9.1. Fenómenos de ecotoxicidad

Generalmente los AHs de síntesis son metabolizados en el tracto digestivo del animal o en el hígado tras la absorción (McKellar, 1997) generando metabolitos inactivos. Sin embargo, algunos pueden ser eliminados vía urinaria o fecal siendo aún biológicamente activos, provocando fenómenos de ecotoxicidad, que afectan a aquellos organismos con ciclos biológicos relacionados con las heces en los pastos (Wall and Strong, 1987; McKellar, 1997; Williams, 1997; Lumaret and Erroussi, 2002; Jensen et al., 2003; Erzen et al., 2005) o a los invertebrados del suelo (Römbke et al., 2010). Actualmente, no se ha descrito ninguna toxicidad respecto a los metabolitos fecales de los benzimidazoles y Levamisol, por el contrario, las lactonas macrocíclicas están asociadas con efectos tóxicos sobre los insectos coprófagos (McKellar, 1997; Wardhaugh and Rodriguez-Menendez, 1988; Lumaret and Erroussi, 2002; Lumaret and Martínez, 2005), dado que el espectro de acción de los endectocitos incluye los insectos. No obstante, esta toxicidad estaría ligada a los modos de administración del formato « bolus », que supone un aumento en la persistencia de las moléculas y de los residuos en las materias fecales y por tanto en la degradación fecal (Strong and James, 1993).

9.2. Aparición de residuos en los productos derivados

La generalización del empleo de los AHs de síntesis dio lugar a la aparición de problemas como la presencia de residuos químicos en los productos derivados (carne o leche) (Waller, 1999; Waller, 2006a). El incremento de la inquietud por parte de los consumidores (Hermansen, 2003) permitió el desarrollo de normas de utilización de éstos, estableciendo los límites en ciertas producciones, que afectan particularmente a las especies lecheras y a los sistemas de producción orgánicos (Anonymous, 2000; Cabaret et al., 2002). Durante la lactancia, el número de AHs utilizables es limitado, debido a que ciertos AHs o sus metabolitos son eliminados a través de la leche, o bien, por la ausencia de estudios relacionados. Estas restricciones entrañan periodos de espera para el consumo de leche, así como la prohibición total de ciertas moléculas sobre las hembras en lactación (Chartier and Hoste, 1997).

En el caso de los sistemas orgánicos, la legislación en el marco de la Unión Europea promueve sistemas de producción basados en la prevención de las enfermedades más que en el tratamiento en sí

mismo. Se permite el empleo de productos fitoterapéuticos u homeopáticos y las prácticas ganaderas que mejoren el sistema inmunitario y refuercen las defensas naturales. Tan solo en el caso de que el uso de que estas medidas resulten inapropiadas, pueden utilizarse medicamentos veterinarios alopáticos de síntesis, incluidos los antibióticos, debiéndose establecer las restricciones pertinentes respecto a los tratamientos y al período de espera impuestos (Consejo Unión Europea, 20 Julio 2007).

9.3. Aparición de fenómenos de resistencia en los parásitos

Los casos de multiresistencia a antihelmínticos se han incrementado en los últimos años, convirtiéndose en un fenómeno mundial (Kaplan, 2004; Wolstenholme et al., 2004; Jackson et al., 2012). Una población de nemátodos GIs resistente a los AHs estaría definida por individuos que han adquirido genéticamente la capacidad de resistir a dosis de AHs generalmente letales para esta especie (Prichard et al., 1980; Sanger and Gill, 1999). Se ha detectado en numerosos AH de síntesis, observándose recientemente casos de resistencia también para el Monepantel (Scott et al., 2013). Es un fenómeno que se desarrolla rápidamente (Waller, 2006b), afectando a especies parasíticas de gran impacto económico en la producción de ovinos y caprinos: *H. contortus*, *Trichostrongylus* spp., *Teladorsagia circumcincta* (Roos et al., 1990; Jackson and Coop, 2000; Kaplan, 2004; Besier, 2007; Scott et al., 2013) *Nematodirus* spp. y *Fasciola hepatica* (Jackson et al., 2012).

La aparición, desarrollo y difusión de resistencias estaría ligado a la presión selectiva asociada al uso repetido de AHs de la misma familia (Jackson and Coop, 2000; Wolstenholme et al., 2004) o a la combinación de tratamientos (Samsom-Himmelstjerna, 2007a). Por este motivo, se hace necesaria la búsqueda de tratamientos alternativos, con la finalidad de evitar y frenar el desarrollo de resistencias a los fármacos y preservar su eficacia, para ello, es preciso comprender los factores intrínsecos y extrínsecos que contribuyen a este fenómeno (Jackson et al., 2012).

Todo ello se recoge y amplía en el capítulo siguiente sobre la lucha y prevención de la aparición de resistencias a los AHs.

10. Lucha y prevención de la aparición de resistencias a los Antihelmínticos

Las estrategias de lucha y prevención de resistencias de los NGIs a los Antihelmínticos (AHs), se centran en el mantenimiento de la susceptibilidad a éstos en las poblaciones de parásitos para ello se dispone de varias prácticas a llevar cabo:

10.1. Una mejor utilización de los Antihelmínticos de síntesis disponibles

Con el fin de preservar la eficacia de los tratamientos AHs y frenar la aparición y difusión de resistencias, es necesario el empleo de estas moléculas de forma razonada y correcta a partir de la comprensión de los factores extrínsecos que favorecen el desarrollo de las mismas (Hoste et al., 2002b; Waller and Thamsborg, 2004). La prevención recae por lo tanto en la comprensión de aquellos errores cometidos que podrían contribuir a la difusión de resistencias:

10.1.1. Aplicación del principio de refugio

La aparición de nuevas resistencias puede ser frenada mediante el mantenimiento de las poblaciones sensibles a AHs en los denominados “refugios” (Silvestre et al., 2002; Chartier and Hoste, 2004; Jackson and Miller, 2006). Se realiza mediante un tratamiento selectivo de los animales más expuestos al riesgo parasitario, lo que permite reducir la presión de selección a los AHs, al dejar una parte de la población parasitada no tratada (Hoste et al., 2002a; Hoste et al., 2002b; van Wyk et al., 2006). Por lo tanto, es preciso identificar y tratar únicamente aquellos animales fuertemente excretores de huevos (Legarto and Leclerc, 2007), a través de medidas parasitarias como la tasa de Huevos excretados (Waller and Thamsborg, 2004), mediante marcadores fisiopatológicos como el sistema FAMACHA© (Vatta et al., 2001; Van Wyk and Bath, 2002; Waller and Thamsborg, 2004; Jackson and Miller, 2006), evaluación del índice de diarrea (DISCO) (Cabaret et al., 2006; Bentounsi et al., 2012), y/ o índices de producción (ganancia de peso, producción de leche o lana, condición general del hospedador, etc.). De este modo podemos proporcionar el tratamiento adecuado e individualizado a cada hospedador (Jackson et al., 2012).

10.1.2. Alternar familias de antihelmínticos

El empleo en exclusiva de una misma familia de AHs, induce una fuerte presión selectiva sobre las poblaciones de nemátodos GIs. En consecuencia la alternancia de las familias de AHs con modos de acción diferentes, permitiría reducir al frecuencia del desarrollo de resistencias (Barnes et al., 1995; Chartier and Hoste, 2004; Legarto and Leclerc, 2007). Un modelo matemático prospectivo, sugiere que la rotación anual sería el ritmo más eficaz en el freno de la difusión de las resistencias (Barnes et al., 1995). Sin embargo, en el caso de los pequeños rumiantes lecheros, esta rotación de AHs podría ser de más fácil aplicación entre el periodo de pastoreo (animales en lactación) y el periodo de estabulado (Chartier and Hoste, 2004).

10.1.3. Aplicación de dosis adaptadas

Para que no se produzcan fenómenos adversos, es necesario evitar las dosis terapéuticas inferiores a las necesarias (Wolstenholme et al., 2004), mediante el control de los instrumentos de distribución y la correcta estimación del peso de los animales para el cálculo de la dosis precisas (Legarto and Leclerc, 2007).

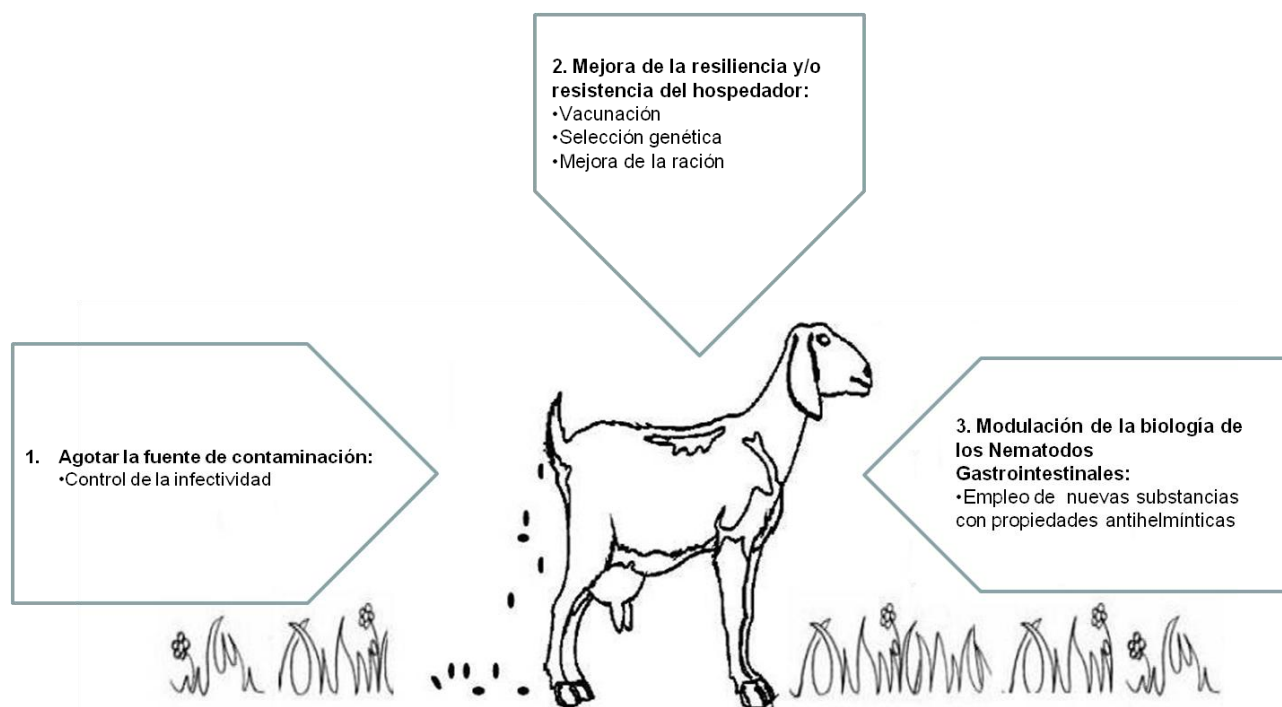
No obstante, también es preciso conocer las particularidades metabólicas de las especies de hospedadores, dado que la farmacocinética de los AHs de síntesis parece diferir en función del hospedador. Por ejemplo, en el ganado caprino parece ser necesario que la dosis de AH sea doblada o repetida para la obtención de la misma eficacia que en ovinos (Smith and Sherman, 1994; Chartier and Hoste, 2004; Jackson et al., 2012).

10.2. Desarrollo de métodos alternativos

A causa de los límites encontrados asociados a los AHs de síntesis, surge la necesidad del desarrollo de métodos antihelmínticos alternativos. Esto se plantea en base a un modelo de lucha integrada, donde se combinan métodos complementarios entre sí, articulados en torno a tres ejes de acción (Hoste et al., 1997; Hoste and Torres-Acosta, 2011) (Fig. 8):

- 1) Actuación sobre la fuente de contaminación,
- 2) Mejora de la resiliencia y/o resistencia del hospedador,
- 3) Modulación de la biología de los nemátodos gastrointestinales.

Fig. 8. Modelo de lucha integrada organizado en torno a 3 ejes de acción: 1) Actuación sobre la fuente contaminación, 2) Mejora de la resiliencia y/o resistencia del hospedador y 3) Modulación de la biología de los nemátodos gastrointestinales.



10.3. Actuación sobre las fuentes de contaminación

Un adecuado manejo de los pastos y del pastoreo, permite limitar el contacto entre los hospedadores y las fases infectivas de los NGIs ((L3s)). De acuerdo con el concepto de “Higiene”, existen distintas estrategias que permiten limitar la contaminación de los pastos.

10.3.1. Agotar la fuente de contaminación de los animales

La actuación sobre la fuente de contaminación tiene como objetivo el bloqueo del ciclo de los nematodos GIs, evitando la infestación de los pastos y reducir al máximo el riesgo de contacto entre los hospedadores susceptibles y las fases (L3s) del nematodo (Hoste and Torres-Acosta, 2011). Existen diversos métodos de gestión del pastoreo que se corresponden con este objetivo, basados en la prevención, la evasión y la dilución (Barger, 1999; Pomroy, 2006). La prevención consiste en la puesta en contacto de los animales sanos con pastos considerados “limpios” (bajo número de L3s). La evasión consiste en la transferencia de animales tratados con AHS desde los pastos contaminados a pastos limpios por dilución (Parkins and Holmes, 1989).

10.3.2. Métodos de dilución

La dilución de la infectividad de los pastos puede realizarse a través de una reducción en la densidad animal en los pastos, por la mezcla de animales sensibles al parasitismo con aquellos más resistentes, mediante la mezcla de animales de distintas edades o por medio del pastoreo mixto, alterno o simultáneo de animales de dos especies con especificidades distintas frente a las especies de NGIs (véase por ejemplo ovinos/bovinos, equinos y pequeños rumiantes) (Niezen et al., 1996; Barger, 1999; Stromberg and Gasbarre, 2006; Legarto and Leclerc, 2007; Kenyon et al., 2009).

10.3.3. Rotación de parcelas

Los principios de prevención y evasión requieren de la disponibilidad de praderas « limpias » o con niveles reducidos de infectividad. Con objeto de sanear las parcelas, un primer método puede consistir en esperar la muerte natural de las L3s presentes en los pastos antes de la vuelta al pastoreo. Esto requiere, no obstante, de un periodo de reposo prolongado basado en la rotación de las parcelas para el pastoreo (Hoste et al., 2004; Pomroy, 2006; Legarto and Leclerc, 2007). Sin embargo, este método parece resultar más útil en zonas tropicales dado que el tiempo de supervivencia de las larvas resulta más corto (hasta 4 semanas) para *Haemonchus contortus* y *T. colubriformis*, mientras que en las regiones templadas la supervivencia puede ser de 6 a 12 meses (Barger, 1999; Hoste et al., 2004) para *Teladorsagia* y *Trichostrongylus* sp. (Hoste and Torres-Acosta, 2011).

10.3.4. Descontaminación activa de los pastos

La descontaminación activa se realiza con la finalidad de reducir y/o exterminar las L3s de los NGIs, mediante métodos químicos o físicos (aplicación de prácticas culturales) o bien a través de métodos de biológicos (hongos nematófagos).

- *Métodos químicos*

Se realizan a través de la aplicación de sustancias químicas como la cal viva (CaO) o la cianamida cálcica (CaCN₂), sugeridas como elementos para descontaminar las praderas (Hoste et al., 2004; Hounzangbe-Adote, 2004). Sin embargo, los resultados en condiciones de uso ganadero del suelo, no han sido tan efectivas contra las L3s como lo esperado (Hoste et al., 2004; Legarto and Leclerc, 2007), posiblemente por la interacción con la materia orgánica presente en el medio (González-Garduño et al., 2010).

- *Métodos físicos: prácticas culturales*

Ciertas prácticas culturales, como el retorno del uso de la praderas como tierras de labor (Hoste et al., 2004; Legarto and Leclerc, 2007) y/o las quemas controladas (Hounzangbe-Adote, 2004), permiten la descontaminación de las praderas. La siega y el ensilado son también métodos interesantes que permiten la reducción de la contaminación (Legarto and Leclerc, 2007).

- *Métodos Biológicos: Hongos nematófagos*

Los hongos nematófagos representan uno de los métodos de descontaminación de pastos fundamentado en el principio de lucha biológica. *Duddingtonia flagrans* es la especie más frecuentemente empleada. por la resistencia de sus esporas (clamidósporas) al tracto digestivo de los hospedadores (Larsen et al., 1997). Se administran vía oral y son excretadas en las heces donde germinan creando una red tridimensional, que atrapa las fases preparasíticas de los NGIs, impidiendo la colonización de los pastos (Larsen et al., 1997; Thamsborg et al., 1999). Aparentemente posee una gran eficacia y baja toxicidad para el hospedador, la degradación de las heces y la fauna de pradera (Fontenot et al., 2003; Paraud et al., 2005). Sin embargo, carece de actividad contra las larvas presentes en las praderas (Thamsborg et al., 1999; Legarto and Leclerc, 2007), así como se han detectado pérdidas de esporas tras su paso rumen-abomaso (Ojeda-Robertos et al., 2009), por lo que este método precisa aún de una mayor profundización.

10.4. Mejora de la tolerancia y/o resistencia del hospedador

Dependiendo del comportamiento alimentario (ramoneo o pastoreo) del hospedador, así como diversos factores ambientales, las respuestas fenotípicas y/o genotípicas frente a los NGIs pueden ser de cierta “tolerancia” a la infección (resiliencia) o de una implementación de su respuesta inmune (resistencia) (Hoste and Torres-Acosta, 2011). Para ello, la estrategia a seguir puede basarse en la vacunación, en la selección de animales resistentes a los NGIs, o bien, en la mejora de la ración de alimento a los hospedadores.

10.4.1. Vacunación

La vacunación representa una de las alternativas en la lucha integrada antiparasitaria. En la actualidad, las investigaciones para el desarrollo de vacunas relacionadas con antígenos naturales y antígenos ocultos de los vermes comienzan a dar sus frutos. El principio de la vacunación se basa en la puesta en contacto con dosis reducidas de antígenos naturales de los vermes, para la estimulación del sistema inmunitario y proteger de cara a futuras reinfestaciones (Waller and Thamsborg, 2004; Jackson and Miller, 2006; Ketzis et al., 2006). Los primeros estudios sobre la vacunación datan de los años 60, mediante la utilización de larvas L3s irradiadas de *H. contortus* y *T. colubriformis* (Mulligan et al., 1961). Posteriormente los estudios fueron profundizando en el empleo de antígenos aislados de los nematodos (Newton, 1995). Se han identificado cuatro categorías de antígenos por sus propiedades inmunógenas:

- 1) Aquellos obtenidos a partir de homogeneizados totales de vermes adultos (Schallig and Van Leeuwen, 1997).
- 2) Productos de excreción- secreción (E/S) (Schallig and Van Leeuwen, 1997).
- 3) Antígenos ocultos (proteínas de las células digestivas de los vermes) (Newton, 1995; Andrews et al., 1997; Knox and Smith, 2001; Muleke et al., 2007).
- 4) Antígenos purificados de la superficie de las L3s (Newton, 1995).

Hasta el momento, los resultados más esperanzadores se encuentra en antígenos ocultos de *H. contortus* (Munn et al., 1997), concretamente en H11, una glicoproteína de membrana de las microvellosidades intestinales (Andrews et al., 1997; Karanu et al., 1997; Munn et al., 1997; Knox and Smith, 2001; Zhao et al., 2012). Estas vacunas estimulan la síntesis de anticuerpos, que posteriormente serán ingeridos por el parásito durante la hematofagia (Knox and Smith, 2001).

Sin embargo, a pesar de los resultados prometedores, la estrategia de vacunación contra los nematodos GIs presenta numerosas limitaciones, como la diferencia de eficacia en función de la edad o el estatus del animal (Jasmer and McGuire, 1991). Particularmente, los fallos de la respuesta inmunitaria de los animales más jóvenes y de las madres en el periodo de partos, complican el empleo de una vacuna (Waller and Thamsborg, 2004). Los antígenos ocultos, además, se limitan en su aplicación a especies hematófagas, puesto que el antígeno puede exponerse en algún momento a la acción del anticuerpo, a diferencia de las especies no hematófagas. Por el momento, los avances en vacunas monoespecíficas frente a *H. contortus* parecen esperanzadores, pero insuficientes debido a la naturaleza mixta de las infecciones por tricostrongilos en la mayoría de los casos (Emery et al., 1999). Del mismo modo, la producción a gran escala está condicionada por las cantidades de antígeno crudo

que pueda obtenerse, de ahí la necesidad de la producción biotecnológica, aunque, los resultados hasta el momento no son del todo satisfactorios (Knox et al., 2001).

10.4.2. Selección genética

La selección de animales resistentes a los nematodos GIs, es una aproximación empleada desde hace años en el hemisferio sur con el objetivo de reducir el empleo de los AHs de síntesis (Albers and Gray, 1987; Windon, 1996; Baker, 1998; Pomroy, 2006). Este concepto ha estado desarrollado a nivel Inter e intra-razas. Se trata de una selección tal, que a través de los años, teóricamente conduce a una reducción de la infestación de los hospedadores y a una progresiva disminución de la contaminación de los pastos (Windon, 1996; Baker, 1998). La selección genética se basaría en la premisa de que la gastroenteritis parasitaria no presenta una distribución normal en los individuos de un mismo rebaño, existiendo animales que nunca presentan niveles elevados de parásitos (Stear et al., 1998; Bishop and Stear, 2003). Ello se sustenta en el hecho de que algunos de los corderos seleccionados resistentes para *H. contortus* también presentaban resistencia frente a *T. colubriformis*, tanto en infestaciones artificiales (Woolaston et al., 1990; Gruner et al., 2004) como naturales (Gray et al., 1992), sugiriendo que, especies resistentes frente a un tipo de nematodo, podrían ser también resistentes frente a otras especies (Sréter et al., 1994). Los beneficios de la selección genética se cree afectan al desarrollo de los parásitos en el hospedador, disminuyendo el número de vermes adultos y a la excreción de huevos (Hoste and Torres-Acosta, 2011). Esto podría deberse a la propia dotación genética del individuo, siendo por lo tanto hereditario. Sin embargo, los mecanismos subyacentes precisan aún de una mayor profundización.

Los criterios que se plantean seguir para la selección genética, avanzan con el objetivo de la mejora de marcadores moleculares, análisis de ADN y ARN (Beh and Maddox, 1996). Mientras, pueden considerarse múltiples factores que influyen en la capacidad para controlar una infección, como la raza, sexo, estado fisiológico y/o nutricional (Barger, 1993; Bishop and Stear, 2003) del hospedador, siendo la variable "individuo" la que parece aceptarse como de mayor relevancia. Así mismo, el empleo de marcadores fenotípicos para la identificación y selección genética comúnmente empleados, se centran parámetros parasitológicos (recuento de huevos en heces y carga parasitaria), fisiológicos (nivel sérico de inmunoglobulinas, eosinófilos y leucocitos) y también patológicos (medida de los niveles séricos de albúmina, pepsinógeno, etc.) (Beh and Maddox, 1996).

Aún así, los programas de selección genética más comunes se basan en la detección a través de la evaluación de los niveles de huevos excretados para la segregación, observándose a lo largo de numerosas experiencias con caprinos y ovinos, una reducción en la excreción fecal de huevos y descenso de la contaminación, con la consecuente modulación de la dinámica de la infección (ver revisión (Hoste and Torres-Acosta, 2011)). Dentro de los inconvenientes encontrados en este método selectivo, podría incluirse la transmisión de caracteres que aumentasen su sensibilidad frente a otros agentes patógenos (Sonstegard and Gasbarre, 2001), así como una selección genética de aquellos parásitos resistentes al sistema inmune del hospedador. No obstante las particularidades climáticas de cada zona y el mosaico genético de las razas, suponen también aspectos propios a considerar a la hora

de diseñar programas de selección genética. Por este motivo, son necesarios avances en biología molecular sobre marcadores de resistencia fiables y en el conocimiento del sistema inmune, para determinar si la selección genética basada en la resistencia, resulta una medida fiable en el control parasitario, o bien, la selección en base a la resiliencia de los hospedadores, puede considerarse una alternativa (Hoste and Torres-Acosta, 2011).

10.4.3. Mejora de la ración del hospedador

Como ya vimos, los estróngilos gastrointestinales están asociados con multitud de lesiones y perturbaciones de la fisiología digestiva, reducción del apetito, malabsorciones/maldigestiones, alteraciones metabólicas, en la retención y/o absorción mineral (fósforo) (Fox, 1997; Coop and Kyriazakis, 2001; Hoste et al., 2005; Knox et al., 2006). Las alteraciones metabólicas, especialmente las de las proteínas, son factores nutricionales limitantes (Coop and Kyriazakis, 2001) respecto al balance energético en la producción ganadera y suponen un efecto importante sobre la regulación de la respuesta inmune del hospedador (Lord, 2002). En consecuencia, en la mayor parte de los estudios se han constatado los beneficios eventuales ligados a la suplementación proteica (Coop and Kyriazakis, 2001; Hoste et al., 2005), que permitirían beneficios en torno a la resiliencia y/o resistencia del hospedador frente a los vermes (ver Hoste et al., 2011). Partiendo de esta premisa, se sugiere que es posible cubrir esa necesidad mejorando la ración de alimento (Coop and Kyriazakis, 1999; Coop and Kyriazakis, 2001), como demuestran las experiencias realizadas en regiones templadas con ovinos infestados por *T. circumcincta*, suplementados en la ración (Valderrábano et al., 2002), así como, en zonas tropicales (Torres-Acosta et al., 2004).

Sin embargo, es preciso señalar las dificultades encontradas para la estimación de las necesidades metabólicas a la hora de ajustar los complementos alimenticios y establecer el balance coste/eficacia. Así mismo, es preciso valorar la relación que se establece entre el hospedador (genética) y el medio (ambiente) en que se desarrolla (ver Hoste et al., 2011).

10.5. Modulación de la biología de los Nematodos gastrointestinales a través de sustancias naturales

Con la finalidad de limitar la aparición de resistencias a AHs de síntesis, surge la posibilidad de la explotación de tratamientos alternativos, que podrían combinarse de forma razonable con tratamientos AHs "clásicos". Estos métodos, se basan en la explotación de sustancias con propiedades antiparasitarias basadas en la farmacopea veterinaria, anterior al desarrollo de los AHs de síntesis.

10.5.1. Plantas bioactivas

La lucha antiparasítica mediante el empleo de plantas bioactivas ricas en metabolitos secundarios (PMS) es una reciente aproximación al control de los NGIs (Githiori et al., 2006; Hoste et al., 2006). Tradicionalmente, la utilización de plantas o extractos vegetales es ampliamente reconocida en la medicina tradicional humana y veterinaria. Sin embargo, las nuevas tendencias, pretenden el manejo de

plantas bioactivas como nutraceuticos (Min et al., 2003; Waller and Thamsborg, 2004; Hoste et al., 2006).

Atendiendo a los resultados obtenidos hasta el momento, las plantas con propiedades AHS, parecen suponer una gran oportunidad en los tratamientos innovadores a explorar, tanto en el hombre como en los animales (Hoste et al., 2012). Los siguientes epígrafes y la línea general de la presente tesis se centran en el empleo de este recurso como tratamiento antihelmíntico.

11. Plantas con propiedades antihelmínticas: plantas bioactivas o nutraceuticas

El interés creciente por parte de los consumidores, en una agricultura que permita productos libres de residuos químicos y, el aumento de las limitaciones en el uso de drogas sintéticas por parte de la UE, han contribuido a incrementar el interés en los productos bioactivos.

La fitoterapia aplicada al control parasitario, basa sus esfuerzos en el tratamiento de los animales parasitados mediante plantas enteras o bien, de preparaciones medicinales que presenten propiedades antihelmínticas (AHs) (Hoste et al., 2011). La forma de aplicación se concibe en todos como remedio medicinal o bien como nutraceutico. Las diferencias entre remedio medical y nutraceutico radican en que, mientras que el remedio medical presenta una acción curativa a corto plazo, el nutraceutico posee propiedades beneficiosas nutritivas, así como potenciales beneficios para la salud (Waller et al., 2001), ejerciendo una acción preventiva a largo plazo o bien una acción curativa en sí misma (Hoste et al., 2012).

○ Nutraceuticos

El término nutraceutico (Andlauer and Fürst, 2002; Waller and Thamsborg, 2004) hace referencia a recursos naturales con valor nutricional, que presentan metabolitos secundarios o nutricinas, que producen, no solo un efecto directo sobre la nutrición del pequeño rumiante, sino que además, repercuten positivamente sobre la salud del mismo.

A diferencia de otras drogas con función terapéutica, el empleo de nutraceuticos en la producción animal, permite, la prevención y el tratamiento de la enfermedad (Andlauer and Fürst, 2002), así como su explotación a largo plazo en la nutrición animal (Hoste et al., 2011). Las principales ventajas radican en su disponibilidad, a un coste de producción asequible, puesto que se trataría de recursos locales. Las posibles limitaciones asociadas a su empleo son debidas principalmente, a la falta de información científica sobre los mecanismos de acción y compuestos activos involucrados, así como de los factores que pueden condicionar su eficacia (Rochfort et al., 2008; Hoste et al., 2012). También es preciso determinar su potencial tóxico y la posología adecuada, para evitar los posibles efectos tóxicos (Waller et al., 2001; Waller and Thamsborg, 2004; Githiori et al., 2005; Githiori et al., 2006; Hördegen et al., 2006).

Para ello, es preciso que profundicemos en las plantas ricas en metabolitos secundarios y aquellos que posiblemente estén relacionados con las actividades nutritiva y antihelmíntica citadas. Los taninos condensados pertenecen al grupo de metabolitos secundarios vegetales que están siendo objeto de estudio en la actualidad (ver Hoste et al., 2011). Por este motivo, esta tesis se centra en la valoración de la actividad AH de diversos nutraceuticos ricos en taninos condensados, con objeto de dilucidar la eficacia de éstos en el control de las verminosis gastrointestinales.

11.1. Empleo de plantas ricas en metabolitos secundarios

El empleo de Plantas ricas en Metabolitos Secundarios (PMS) y más concretamente ricas en taninos condensados, se articula en torno a varios principios complementarios:

1) Actuación sobre el hospedador, a través de la eliminación y/o modulación de la biología de los parásitos mediante métodos AHs naturales.

2) Mejoras en la nutrición del hospedador que permitan incrementar su resiliencia y contrarrestar las consecuencias de los NGIs.

3) Intervención sobre los pastos: disminución de la infestación, a través de mejoras en el manejo del pastoreo que permitan reducir la contaminación parasitaria del medio.

Estos y otros aspectos se verán desarrollados con mayor profundidad en los siguientes epígrafes.

11.2. Mecanismos de acción de las plantas ricas en metabolitos secundarios

Hoy día, aún se conoce muy poco sobre los mecanismos de acción de las plantas ricas en metabolitos secundarios (PMS). Los estudios realizados en las últimas décadas en torno a hierbas curativas y nutraceuticos, se centran en: 1) La identificación de recursos potenciales que puedan ser empleados, 2) El análisis y verificación *in vitro* de su potencial AH y la ausencia de toxicidad, 3) La caracterización de los mecanismos de acción directos (de tipo farmacológico), indirectos (respuesta del hospedador) (Hoste et al., 2012) y la determinación de las moléculas implicadas, 4) La validación *in vivo* a través de modelos animales (roedores y/o rumiantes), 5) La verificación de su uso potencial en condiciones de producción ganadera (Hoste et al., 2012).

Hasta el momento, el estudio de algunos forrajes y plantas forrajeras ricas en taninos ha demostrado la posible utilidad de éstos, en la lucha contra la parasitosis gastrointestinal (Niezen et al., 1998a; ; Paolini et al., 2003b; Barrau et al., 2005; Paolini et al., 2005a). No obstante, algunos autores sugieren que además de los taninos, otros metabolitos secundarios vegetales podrían afectar a la biología de los vermes (Molan et al., 2003a). De ahí el interés suscitado en el conocimientos de las plantas ricas en taninos (PRT) y sus posibles mecanismos de acción.

12. Metabolitos secundarios: estructura, biosíntesis y propiedades generales

Se obtienen a través del metabolismo secundario de los vegetales y presentan una distribución celular variable en el reino vegetal. Están implicados en funciones defensivas y/o de atracción para la reproducción (Ej.: pigmentos atrayentes de los insectos polinizadores), a diferencia de los metabolitos primarios, que poseen roles fundamentales en el metabolismo celular (nutrición y crecimiento vegetal) y tienen una distribución aproximadamente similar en las células (Salunkhe et al., 1990).

Los metabolitos secundarios incluyen terpenos (hormonas y pigmentos esenciales), compuestos fenólicos (cumarinas, lignina, flavonoides y taninos), glicósidos (saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos) (Ávalos García and Pérez-Urria Carril, 2009) y alcaloides (Hagerman, 2002a). Dentro de éstos nos centraremos en los compuestos fenólicos, cuyos efectos AHs parecen estar contrastados.

12.1. Estructura química de los compuestos fenólicos

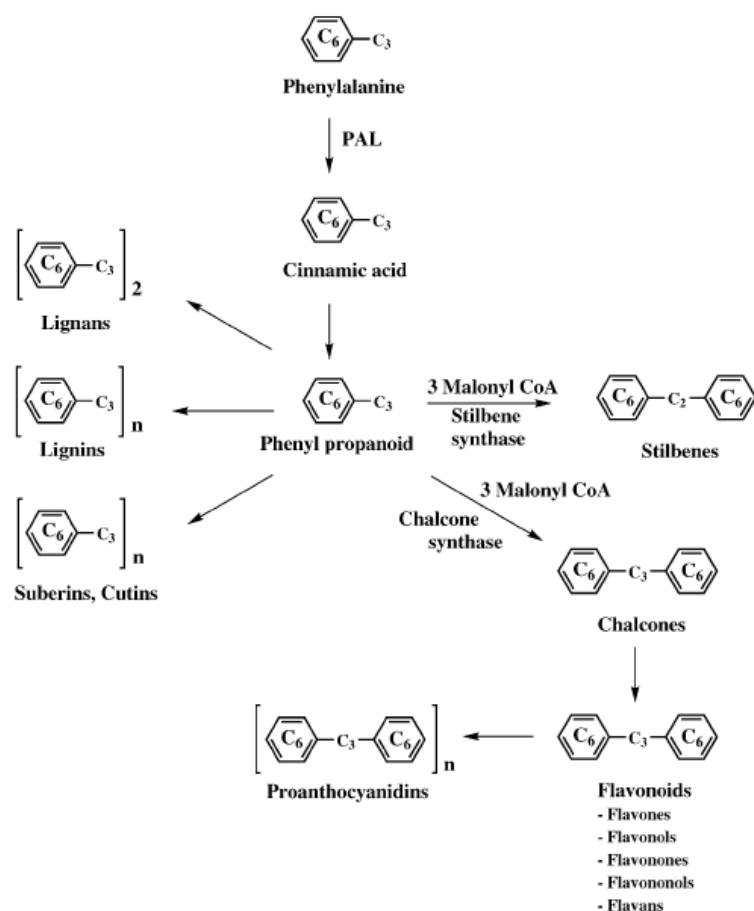
Los compuestos fenólicos, también reciben el nombre de polifenoles o fenilpropanoides. Derivan del fenol, un anillo aromático con uno o varios grupos hidroxilo (Taiz and Zeiger, 2012), así como una serie de sustituyentes (Salunkhe et al., 1990). Se conocen alrededor de 10000 de estos compuestos, de los cuales solo algunos de ellos son solubles en solventes orgánicos mientras que los ácidos carboxílicos y glicósidos, lo son en agua. En el caso de los polímeros, éstos resultan ser bastante insolubles (Salunkhe et al., 1990). Los compuesto fenólicos abarcan un amplio grupo, desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos (derivados del ácido benzoico y cinámico) a cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos hidrolizables, taninos condensados, lignanos y lignina (Naczki and Shahidi, 2004). Mientras que los fenoles vegetales no son considerados tóxicos bajo condiciones y concentraciones normales, los fenoles poliméricos tales como los taninos, podría ser una excepción (Salunkhe et al., 1990), destacando por su reactividad química y actividad biológica (Naczki and Shahidi, 2004).

12.2. Biosíntesis

En la biosíntesis de los compuestos fenólicos existen dos rutas implicadas: la ruta del ácido malónico y la ruta del ácido siquímico. La ruta del ácido malónico, es la fuente de fenoles en hongos y bacterias y raramente aparece en plantas. La ruta del ácido siquímico es común en plantas, hongos y bacterias. A partir de las eritrosa-4 fosfato y el ácido fosfoenolpirúvico (procedentes de la ruta de las pentosa-fosfato y de la glicólisis respectivamente), se obtienen compuestos intermedios como el ácido siquímico y, a partir de éste, se sintetizan los aminoácidos aromáticos: fenilalanina, triptófano y tirosina (Taiz and Zeiger, 2012). Esto, confiere a los vegetales la propiedad de ser fuente de aminoácidos esenciales, que los animales superiores no son capaces de sintetizar (Ávalos García and Pérez-Urria Carril, 2009). La mayoría de compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina, por un proceso de desaminación catalizado por la Fenilalanina Amonio Lipasa (PAL), que da lugar a la consecuente formación de ácidos cinámico y cumárico, precursores de la lignina, flaonas, isoflaonas y flavonoides (Fig. 9). Los ácidos cinámico y cumárico, así como sus derivados, son compuestos fenólicos simples llamados fenilpropanoides, por contener un anillo de benceno (C6) y una cadena lateral de tres

carbonos (C3) (Ávalos García and Pérez-Urria Carril, 2009). Las reacciones que se producirán posteriormente se basarán fundamentalmente en la adición de grupos hidroxilo y otros sustituyentes.

Fig. 9. Biosíntesis de fenilpropanoides, estilbenos, lignanos, ligninas, suberinas, flavonoides y taninos a partir de la fenilalanina (Naczk and Shahidi, 2004).



12.2.1. Ácidos fenólicos

Destacan dos familias ampliamente distribuidas en los vegetales una procedente de la sustitución del ácido benzoico (C_6-C_1) y otra derivada del ácido cinámico (C_6-C_3). Ambos tipos pueden aparecer en forma conjugada o esterificada. Dentro de los derivados del ácido benzoico, encontramos ácidos gálico, vainillina y ácido salicílico (Ávalos García and Pérez-Urria Carril, 2009) y dentro de los cinámicos: caféico, ferúlico, sinápico, etc., frecuentemente esterificados con quinina y otros azúcares (Salunkhe et al., 1990; Naczk and Shahidi, 2004). La biosíntesis del ácido gálico se supone englobada en la síntesis del ácido siquímico, a partir del ácido 3-dehidrosiquímico, que daría lugar al ácido gálico. Igualmente, el ácido cinámico procedente de la fenilalanina también puede actuar de precursor del ácido gálico. El precursor del ácido elágico (ácido hexahidroxidifénico), se cree que provendría de la oxidación del ácido gálico y otra serie de oxidaciones posteriores (Salunkhe et al., 1990).

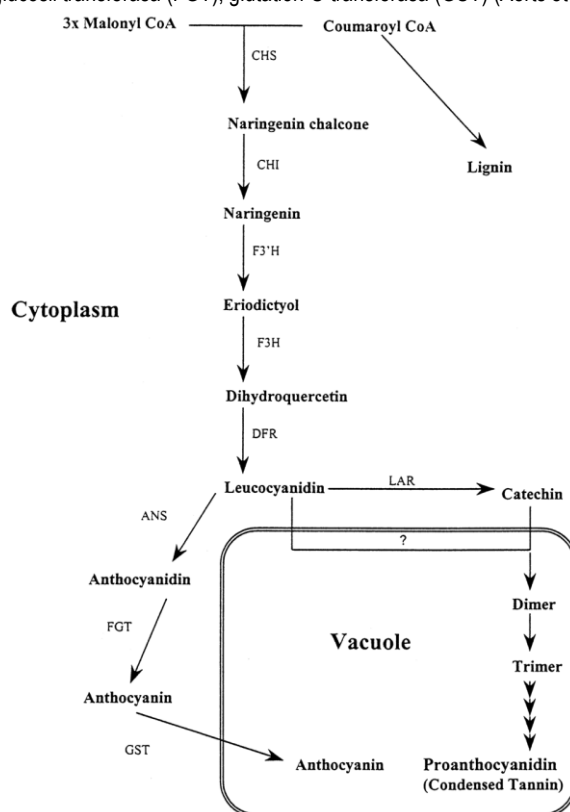
12.2.2. Flavonoides

Constituyen el grupo más amplio y diverso de compuestos fenólicos en plantas, que incluyen chalcones, flavanones, flavones e isoflavones, flavonoles y antocianinas (Salunkhe et al., 1990). Tienen un origen biosintético mixto, por convergencia de las rutas del siquimato y la del acetato. Las primeras reacciones enzimáticas son comunes para las proantocianidinas y antocianidinas y tienen lugar en el citoplasma, mientras que la maduración y polimerización de los taninos condensados (TCs) tiene lugar en las vacuolas (Aerts et al., 1999; Waghorn, 2008).

La biosíntesis de los flavonoides, se produce en el citoplasma a partir de la condensación de tres moléculas de malonil-CoA con una molécula de p-cumaril-CoA, catalizada por la Chalcona Sintasa (CHS) (Aerts et al., 1999) y que da lugar a la chalcona (Ávalos García and Pérez-Urria Carril, 2009). A continuación, se producirán una cascada de reacciones enzimáticas hasta la producción de leuco(anto)cianidín. El leucoantocianidín puede dar lugar a productos para la síntesis de antocianidinas o bien, catequina mediante una reacción catalizada por la Leucoantocianidín Reductasa (LAR) (Aerts et al., 1999). En la vacuola, la catequina tras un proceso de maduración dará lugar a las proantocianidinas (PA) o también llamados, taninos condensados (TCs), (Koupai-Abyazani et al., 1992; Koupai-Abyazani et al., 1993) (Fig. 10).

Químicamente, la formación de los TCs implica a los flavan-3-4-dioles, que son moléculas muy reactivas que reaccionan sobre los carbonos en posición 8 ó 6 de los Flavan-3-ol (Bruneton, 1999; Schofield et al., 2001a).

Fig. 10. Biosíntesis de proantocianidinas (Taninos Condensados) y Antocianidinas. Enzimas: chalcona sintasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI), flavanona-3'-hidroxilasa (F3'H), flavanona-3-hidroxilasa (F3H), dihidroflavanol reductasa (DFR), leucoantocianidín reductasa (LAR), antocianin sintasa (ANS), flavanol-UDP-glucosil transferasa (FGT), glutatión-S-transferasa (GST) (Aerts et al., 1999).



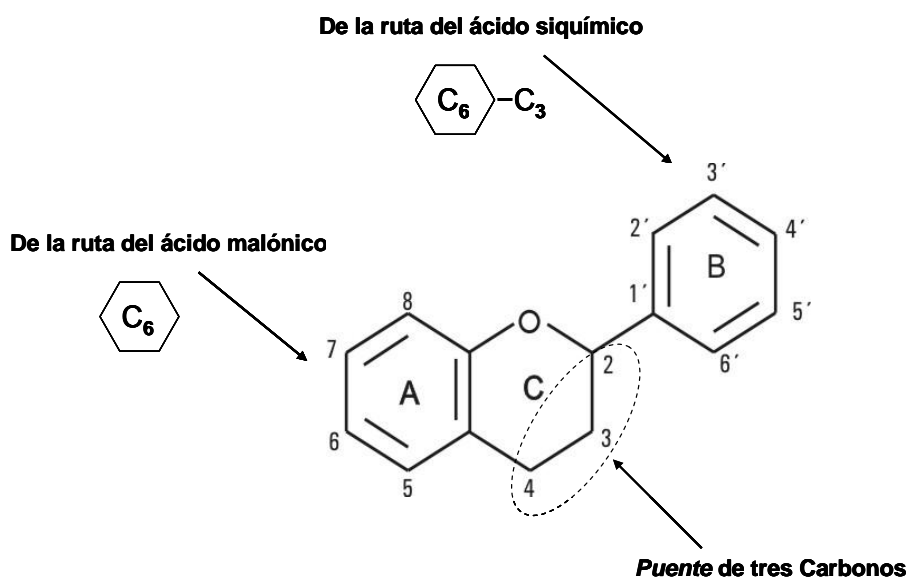
13. Flavonoides: estructura química, propiedades y clasificación

A partir de un esqueleto carbonado heterocíclico y dependiendo de los sustituyentes, presencia o no de dobles enlaces y/o enlaces con otras moléculas, se genera a un amplio espectro de flavonoides diferentes con funciones y propiedades distintas.

13.1. Estructura química

El esqueleto de los flavonoides está formado por 15 átomos de carbonos distribuidos en tres anillos (C6-C3-C6): dos anillos bencénicos de seis átomos de carbono ("A" y "B"), conectados mediante un anillo heterocíclico "C" de 3 átomos de carbono (Martínez, 2005) pirano o pirona (Martínez-Flórez et al., 2002), dependiendo de si tiene un doble enlace en posición C4. Todos los flavonoides comparten la estructura básica C6-C3-C6, los carbonos se enumeran del 2 al 8 para los anillos C y A y del 2' al 6' para B (Martínez-Flórez et al., 2002) (Fig. 11).

Fig. 11. Esqueleto carbonado básico de los Flavonoides: C6-C3 procedente de la ruta del ácido siquímico y C6 proveniente del la ruta del ácido malónico. Basado en: (Silva et al., 2002; Zeiger and Taiz, 2007).



13.2. Propiedades y clasificación

Las propiedades de los flavonoides dependen de los grupos hidroxifenólicos y de las características de su estructura química, produciéndose en la estructura básica multitud de variaciones y sustituciones, en el anillo o cadena C (Martínez-Flórez et al., 2002). La presencia de un gran número de sustituyentes (grupos metilo, hidroxilo, residuos de azúcares en el grupo O- y los enlaces C-glicosídicos), dará lugar a un amplio y complejo espectro de flavonoides diferentes (Salunkhe et al., 1990). En los vegetales, en la mayoría de las ocasiones, los flavonoides aparecen ligados a carbohidratos, por lo que reciben el nombre de glicósidos, mientras que si no tienen ligadas moléculas de carbohidratos reciben el nombre de agliconas flavonoides (Martínez, 2005). Algunos flavonoides (flavonoles y flavonas) se presentan como O- glicósidos al establecer enlaces con distintos azúcares, generalmente en C3 y con menor frecuencia, en C7 del anillo A (Martínez-Flórez et al., 2002). Estos enlaces, pueden establecerse a través de un grupo -OH o por el contrario, es un enlace C-C, por lo que recibirán el nombre de O-glicosiflavonoides o C-glicosiflavonoides.

El tipo del enlace condicionará la estabilidad, solubilidad, resistencia a la degradación enzimática y la reactividad. Existen multitud de flavonoides, algunos de los cuales podemos identificarlos como flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavononas, flavanoles, antocianidinas y también flavononoles (Raj Narayana et al., 2001; Nacz and Shahidi, 2004), chalconas, auronas, pterocarpanos, rotenoides, etc. (Martínez, 2005).

Algunos de los flavonoides más importantes se recogen a continuación. Respecto a su nomenclatura es preciso recalcar las diferencias entre la nomenclatura española, donde se emplean los sufijos -INA u -OL para citarlos, mientras que en la inglesa, la terminación es en -IN u -OL (Tabla 4).

- **Flavonas:** como la Diosmetina, que posee un doble enlace entre los carbonos C2 y C3, un grupo carbonilo en posición 4 y carecen de -OH en posición 3 del anillo C. Destacan: Apigenina, Baicaleína, Crisina, Diosmetina, Diosmina, Flavona, Luteolina...

- **Isoflavonas:** Isómeros de los flavones, pero con una migración de un grupo arilo con el mismo esqueleto de C15: Daidceína, Genisteína, Prunetina, Pratenseína...

- **Flavonoles:** como la Quercetina, poseen un doble enlace entre los carbonos C2 y C3, un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C: Quercetina, Rutina, Fisetina, Galangina, Kaempferol, Morina, Miricetina, Ramnetina, Robinina, etc.

- **Flavononas:** Eriodictiol, Hesperidina, Naringina, Naringenina y Pinocembrina, que presentan un grupo carbonilo en posición C4 del anillo C.

- **Flavanoles:** parecen ser los únicos que no se presentan como glicósidos, pero muestran gran reactividad a la polimerización y la formación de Taninos Condensados. Destaca la catequina con un grupo -OH, en la posición 3 del anillo C: (+)-Catequina (C), (+)-Galocatequina (GC), (-)-Epicatequina (EC), (-)-Epigalocatequina (EGC), (-)-Epicatequina 3-galato, (-)-Epigalocatequina 3-galato (EGCG), Teaflavina, Tearubiginas.

- **Antocianidinas:** tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C: Cianidina, Delfinidina, Diosmetinidina, Malvidina, Pelargonidina, Peonidina.

Como vemos, dependiendo de aspectos estructurales como, 1) la presencia en el anillo B de catecol u O-dihidroxi; 2) presencia de doble enlace en posición 2,3 y/o 3) presencia de grupos hidroxilos en posición 3 y 5, la función y propiedades de los flavonoides se verá condicionada. Así los flavonoles y flavonas glicósidos son más solubles en agua pero menos reactivos a radicales libres por citar algunos ejemplos (Martínez-Flórez et al., 2002).

Tabla 4: Algunos de los flavonoides más importantes (Naczk and Shahidi, 2004; Zayas, 2005).

Flavonas	Isoflavonas	Flavonoles	Flavononas	Flavanoles	Antocianidinas
Diosmetina	Daidceína	Quercetina	Eriodictiol	(+)-Catequina (C)	Cianidina
Apigenina	Genisteína	Rutina	Hesperidina	(+)-Galocatequina (GC)	Delfinidina
Baicaleína	Prunetina	Fisetina	Naringina	(-)-Epicatequina (EC)	Diosmetinidina
Crisina	Pratenseína	Galangina	Naringenina	(-)-Epigallocatequina (EGC)	
Diosmina		Kaempferol	Pinocembrina	(-)-Epicatequina-3-galato (ECG)	Malvidina
Flavona		Morina		(-)-Epigallocatequina -3-galato (EGCG)	Pelargonidina
Luteolina		Miricetina		Teaflavina	Peonidina
		Ramnetina		Tearubigina	
		Robinina			

14. Taninos

Fue A., Seguin el primero en acuñar la palabra tanino para referirse a sustancias vegetales capaces de transformar la piel de los animales en cuero, pero no todos los polifenoles vegetales exhibían esa capacidad taninífera (Seguin, 1797). Entre los fenoles poliméricos, (Bate-Smith, 1973), definía como taninos vegetales, a aquellos compuestos fenólicos hidrosolubles con un peso molecular entre 500 y 3000Da, con un número suficiente de hidroxilos fenólicos u otros grupos susceptibles de precipitar alcaloides, gelatinas y otras proteínas. La habilidad para establecer enlaces con proteínas a través de puentes de hidrógeno, enlaces covalentes e interacciones de tipo hidrofóbico les conferiría unas características únicas, como la interacción con las proteínas salivares y glicoproteínas en la boca, responsables de la astringencia, condicionando la palatabilidad de los vegetales.

Haslam, substituyo el término tanino por polifenol, para enfatizar los múltiples grupos fenólicos característicos de esos compuestos, anotando la propiedad de moléculas de peso molecular igual o superior a 20000Da y su capacidad no solo, de formar enlaces con las proteínas y alcaloides, sino también con ciertos polisacáridos (Haslam, 1989; Hagerman, 2002a).

Actualmente, consideramos como taninos a un grupo diverso de compuestos fenólicos de peso molecular variable entre los 500 a 28000Da (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992; Schofield et al., 2001a).

14.1. Clasificación

Los taninos, son compuestos fenólicos poliméricos de gran variabilidad, que se clasifican generalmente en dos grupos principales en base a su estructura, función y origen biosintético: Taninos Hidrolizables (THs) compuestos por un glúcido y un ácido fenólico y, flavonoides poliméricos, polímeros de flavan-3-ols: las Proantocianidinas (PA) (Hagerman, 2002a), también conocidos como Taninos Condensados (TCs) (Mueller-Harvey, 2001; Schofield et al., 2001a).

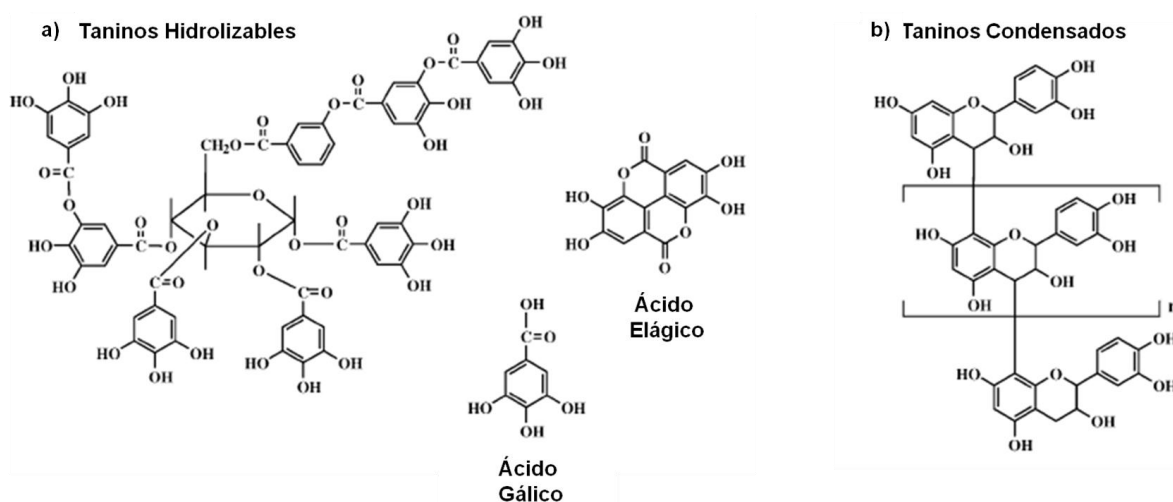
14.1.1. Taninos hidrolizables (THs)

Constituidos por un glúcido cuyos grupos hidroxilo están esterificados total o parcialmente por ácidos fenólicos (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992; Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999; Mueller-Harvey, 2006) como el ácido gálico o el ácido elágico. Dependiendo de éste, se clasifican en: Galotaninos (ácido gálico) o Elagitaninos (ácido elágico) (Hagerman, 2002a) (Fig. 12a). Aunque los THs generalmente presentan un peso molecular relativamente pequeño, mediante enlaces oxidativos pueden dar lugar a polímeros más importantes (Mueller-Harvey, 2001), en los que los triésteres de gran peso molecular podrían presentar las características clásicas de los taninos (Bruneton, 1999). El término hidrolizable se debe a su sensibilidad frente a la hidrólisis ácida. Pueden ser fácilmente degradados en el rumen, dando lugar a compuestos fenólicos como el ácido gálico y sus metabolitos pirogalol y resorcinol, ácido elágico y otras pequeñas moléculas (Díez et al., 2008). Estos compuestos pueden ser absorbidos en el tracto digestivo de los rumiantes (Bruneton, 1999), pudiendo causar efectos tóxicos (Mueller-Harvey, 2001; Hoste et al., 2006) generalmente en forma de lesiones hepáticas y renales (Zhu et al., 1992; Jean-Blain, 1998; Plumlee et al., 1998).

14.1.2. Taninos condensados (TCs) o proantocianidinas

Se denominan también proantocianidinas porque al reaccionar con HCl/butanol, liberan cloruro de antocianidina de intenso color rojo. Los TCs son polifenoles de la familia de los flavonoides (Bruneton, 1999; Mueller-Harvey, 2006), que presentan una compleja estructura basada en un sistema heterocíclico (Hagerman, 2002a) (Fig. 12b) y son oligómeros o polímeros de unidades de Flavan-3-ols (Haslam, 1996; Bruneton, 1999).

Fig. 12. Estructura molecular de: a) Taninos Hidrolizables: Ácidos Gálico y Elágico (Izda.), b) Taninos Condensados o Proantocianidinas (Dcha.) (Naczka and Shahidi, 2004).



14.2. Estructura química de los taninos condensados

La unidad básica de los Taninos Condensados es el flavan-3-ol que suele polimerizar hasta dar polímeros de más de 20 unidades (Waghorn, 2008). Los monómeros de Flavan-3-ol normalmente se refieren a las catequinas. Se caracterizan, por la presencia de dos átomos de carbono asimétricos que les confieren la propiedad de tener isómeros, existiendo (+) y (-) Catequina y (+) y (-) Epicatequina aunque, sólo el (+)-Catequina y el (-)-Epicatequina son comunes en la naturaleza (Salunkhe et al., 1990). De la adición de un tercer grupo fenólico en el anillo B, se obtienen Epigalocatequín y Galocatequín (Hagerman, 2002a). Las principales variaciones entre los TCs radican por tanto, en el número de grupos -OH en los anillos A y B, la posición de éstos, la estereoquímica de los carbonos 2, 3 y 4 del anillo C y la posición, tipo de enlace y número de unidades de flavanol (Waghorn, 2008).

Los flavan-3,4-diols o leucoantocianidinas son flavonoides monoméricos y, pese a tener una reactividad química similar a los TCs, no forman complejos con las proteínas para precipitarlas (Hagerman, 2002a). Los flavan-4-ol, son también leucoantocianidinas, que dan lugar a antocianidinas ante tratamiento con alcohol a temperatura ambiente (Hagerman, 2002b).

14.2.1. Enlaces interflavánicos

Los monómeros pueden aparecer unidos por enlaces C-C (Tipo B) o C-O-C (Tipo A) (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992; Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999; Feucht and Treutter, 1999b; Schofield et al., 2001b). Los enlaces Interflavánicos para los flavan-3-ols, son principalmente de tipo B (C-C), entre el C4 del monómero terminal y el C8 del monómero que se añade, lo que dará lugar a polímeros lineales (4-8). Los homopolímeros más abundantes en los vegetales superiores, están compuestos con un solo tipo de flavan-3-ol en su estructura (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992; Hagerman, 2002b): Catequina (C) o Epicatequina (EC) (ambos con 2 grupos -OH en el anillo B del monómero de flavanol). Producen Cianidín, por lo que son conocidos por Procianidinas (PCs). Los homopolímeros de base Galocatequina o Epigalocatequina (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992; Bruneton, 1999) poseen 3 grupos -OH en el anillo B (Waghorn, 2008) producen Delfinidín y se les denomina Prodelfinidinas (PD) (Hagerman, 2002a). También, se producen enlaces entre el C6 del monómero terminal y el C4 del monómero que se añade (Bruneton, 1999; Feucht and Treutter, 1999b; Hagerman, 2002a) dando lugar a estructuras ramificadas (C4→C8, C4→C6). Es característico de polímeros del 5-desoxi-flavan-3-ol, donde las ramificaciones son abundantes por la reactividad del 5-desoxi del anillo A. Esto da lugar a Profisetinidinas y Prorobinetinidinas, taninos abundantes en el quebracho (*Schinopsis* spp.) y en las preparaciones de acacia (Hagerman, 2002a).

Los enlaces Tipo A (C-O-C) son los menos estudiados y en ellos intervienen a la vez enlaces C4-C8 y enlace C2-O-C7 entre 2 monómeros (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992; Mueller-Harvey, 2006). Son característicos de los flavan-3-4-diols y dan lugar a las A2-proantocianidinas correspondientes (Hagerman, 2002a).

Finalmente, según el grado de polimerización, podemos encontrar:

- Oligómeros (de 2 a 10 monómeros).
- Polímeros (más de 10 monómeros).

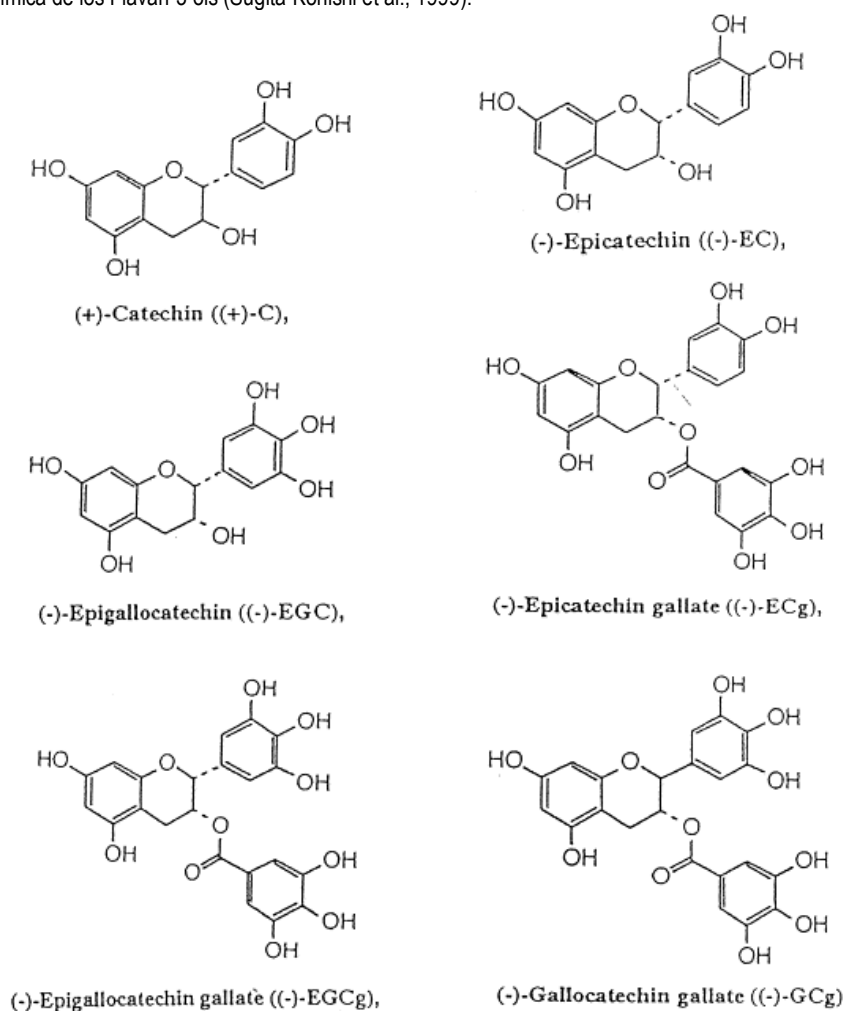
14.3. Tipos de taninos condensados

Como ya vimos en la sección anterior, depende de la naturaleza química de los grupos "R" del anillo B, de los enlaces interflavánicos, del tipo de monómeros constituyentes y del grado de polimerización. Fundamentalmente, podemos diferenciar cuatro clases de homopolímeros de flavan-3-ols: Procianidinas (PCs), Prodelfinidinas (PDs), Profisetinidinas y Prorobinetinidinas. Las Profisetinidinas y Prorobinetinidinas son más raramente encontradas (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992; Collingborn et al., 2000) (Tabla 5). Los PCs y PDs se diferencian en la posición de un grupo -OH que les confiere la capacidad de formar complejos con proteínas (Aerts et al., 1999; Mueller-Harvey, 2006) (Fig. 13).

También podemos encontrar en ciertas plantas, heteropolímeros constituidos por monómeros de distinta naturaleza (Hedqvist et al., 2000; Mueller-Harvey, 2006), formados a la vez por C o EC y GC o EGC (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992), como es el caso de la esparceta (*Onobrychis viciifolia*) (Marais et al., 2000).

Tabla 5. Clasificación de los monómeros constituyentes de los Taninos Condensados, clases de Homopolímeros y grupos hidroxilo asociados.

Flavan-3-ols	Clases de Homo-polímeros	Número de Grupos –OH
Catequina (C)	Procianidinas	5
Epicatequina (EC)	Procianidinas	5
Galocatequina (GC)	Prodelfinidinas	6
Epigalocatequina (EGC)	Prodelfinidinas	6
Fisetinidina	Profisetinidinas	4
Robinetinidina	Prorobinetinidinas	5

Fig. 13. Estructura química de los Flavan-3-ols (Sugita-Konishi et al., 1999).

En las leguminosas las más abundantes son las PDs y las PCs cuya proporción es variable dependiendo de la especie de planta en cuestión y/o de las variedades (Mueller-Harvey, 2006). Algunos autores (Molan et al., 2003b; Brunet and Hoste, 2006; Brunet et al., 2008a; Hoste et al., 2011) sugieren que el papel AH de las PDs es más importante que las PCs. En cualquier caso, dependiendo del tipo y número de monómeros, las propiedades de los taninos serán de un tipo o de otro como ya veremos en el siguiente epígrafe.

14.4. Propiedades generales de los taninos

Bajo el término tanino, se engloban diversos oligómeros y polímeros. Dada su particular estructura bioquímica, pueden establecer enlaces y formar complejos con múltiples macromoléculas, proteínas, hidratos de carbono e iones metálicos (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992; Haslam, 1996). Lo que les confiere unas propiedades físico-químicas y biológicas particulares: agentes quelantes de iones metálicos, precipitación de proteínas, agentes antioxidantes, etc. (Hagerman, 2002c).

A continuación se describe las propiedades generales asociadas a los taninos, para más adelante profundizar en aspectos más concretos de los TCs, que justifican su inclusión en nuestras experiencias.

14.4.1. Propiedades físico químicas

Los taninos difieren entre sí respecto a su solubilidad, capacidad oxidativa y fuerza de enlace con las proteínas y son especialmente sensibles a la concentración de oxígeno, temperatura y pH alcalinos, entre otros.

- Solubilidad

La solubilidad en agua dependerá de su peso molecular y grado de polimerización (Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999). Igualmente son solubles en acetona y alcoholes, lo que explica que la mayoría sean extractados a partir de soluciones acetona- agua o metanol agua (Makkar, 2003).

- Formación de complejos con las proteínas

Los taninos se unen a las proteínas, formando complejos solubles o insolubles dependiendo del pH fisiológico (Haslam, 1996; Zimmer and Cordesse, 1996; Aerts et al., 1999), que se disocian a pH alcalino ($>7,5$) o ácido ($<3,5$) (Min et al., 2003), como el que tiene lugar en el abomaso ($\text{pH} = 2-3$).

En la formación de estos complejos, intervienen interacciones de tipo hidrofóbico o enlaces por puentes de hidrógeno, formando complejos dinámicos dependientes del tiempo (Haslam, 1989). El grado de afinidad tanino-proteína, depende de la estructura y la configuración tridimensional de los dos tipos de moléculas intervinientes (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992; Poncet-Legrand et al., 2006): taninos de gran peso molecular y flexibilidad estructural (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992) (ver (Frutos et al., 2004)) y proteínas con una conformación abierta, peso molecular superior a 20K Dalton, ricas en aminoácidos hidrófobos como la prolina y la hidroxiprolina (Zimmer and Cordesse, 1996; Jean-Blain, 1998; Hagerman, 2002a).

Dependiendo de las condiciones ambientales (pH, temperatura, fuerza iónica o la presencia de moléculas competitivas), se pueden establecer distintos tipos de complejos:

a) Complejos reversibles

Las interacciones tanino-proteína tienen carácter reversible Ph-dependiente, cuando ocurren en condiciones no oxidantes, dentro de un pH próximo a 7 (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992; Zimmer and Cordesse, 1996; Jean-Blain, 1998; Bennick, 2002; Poncet-Legrand et al., 2006). Mediante puentes de hidrógeno entre los grupos -OH de los grupos fenólicos y el oxígeno de los grupos amida de las proteínas, o por interacciones hidrofóbicas entre el anillo aromático de los compuestos fenólicos y las regiones hidrofóbicas de la proteína (Frutos et al 2004).

b) Complejos irreversibles

Los complejos irreversibles se producen ante estrés oxidativo. Los grupos fenólicos de los taninos tienden a auto-oxidarse en O-quinonas, que interactúan con las proteínas mediante enlaces covalentes de carácter irreversible (Bruneton, 1999; Feucht and Treutter, 1999a). No obstante, la estabilidad de estos complejos dependerá de las condiciones ambientales, en una gama de pH entre 3,5 y 7,0 (Jones and Mangan, 1977).

14.4.2. Propiedades biológicas

Dada la capacidad de los taninos para formar complejos con las proteínas, pueden unirse directamente a los centros activos de las enzimas o bien, indirectamente, unirse al sustrato potencial de naturaleza proteica, contribuyendo a la inhibición enzimática (Zimmer and Cordesse, 1996).

14.4.3. Propiedades antioxidantes

Se deben a la presencia de grupos hidroxilo fenólicos con propiedades quelantes del hierro y otros metales de transición. Esto les confiere unas propiedades antioxidantes, ejerciendo un papel protector frente al daño de carácter oxidativo (Hagerman, 2002a; Martínez-Flórez et al., 2002). Las actividades antimutagénicas y anticancerígenas han sido atribuidas igualmente a esta propiedad antioxidante (Chung et al., 1998; Jung and Ellis, 2001; Richelle et al., 2001). Los grupos fenólicos permiten protección frente a radicales libres (Hagerman, 2002a) altamente reactivos evitando así, perturbaciones en el ADN.

14.4.4. Propiedades antisépticas

Algunos remedios fitoterapéuticos con plantas ricas en taninos se basan en sus propiedades antimicrobianas (Chung et al., 1998; Hatano et al., 2005; Song et al., 2006), fungicidas (Baba-Moussa et al., 1999; Bruneton, 1999) o antivirales (Chung et al., 1998; Yamaguchi et al., 2002; Song et al., 2005).

14.5. Distribución de los taninos en la naturaleza

Los taninos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en árboles, arbustos y plantas herbáceas leguminosas (McLeod, 1974; Perevolotsky, 1994; Frutos et al., 2004), de regiones tropicales,

áridas o semiáridas y/o templadas. Aparecen en las familias Betulaceae (*Betula*), Cesalpinaceae (*Ceratonia*), Cistaceae (*Cistus*), Cupresaceae (*Juniperus*), Ericaceae (*Calluna*, *Erica*, *Vaccinium*), Fagaceae (*Castanea*, *Quercus*), Leguminaceae (*Cytisus*, *Genista*, *Lathyrus*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*), Poaceae (*Holcus*, *Hordeum*, *Lolium*, *Sorghum*, *Triticum*), Rosaceae (*Crataegus*, *Rosa*, *Rubus*) y Salicaceae (*Salix*) entre otras (Frutos et al., 2004).

14.6. Distribución y localización de los taninos en los vegetales

En general, los compuestos fenólicos no presentan una distribución uniforme en los vegetales, siendo más abundantes en aquellas partes más susceptibles de ser ingeridas por los herbívoros (hojas y flores por ejemplo). El mayor o menor contenido en taninos en los vegetales, estará condicionado por los efectos medioambientales, estacionales y de la fenología vegetal (Frutos et al., 2004).

A nivel celular, los THs se encuentran en las paredes celulares y espacios intercelulares, mientras que los TCs se almacenan en las vacuolas de forma libre o unidos a otras fibras como la lignina de las paredes celulares o a proteínas celulares (Terrill et al., 1992b; Frutos et al., 2002; Naczki and Shahidi, 2004) y en la epidermis y tricomas de las hojas (Bate-Smith, 1975; Li et al., 1996).

Debido a que la presencia de los THs es minoritaria en los forrajes de las zonas templadas y a su potencial tóxico, el objeto de interés de este trabajo han sido los TCs, abundantes en forrajes, árboles y arbustos (Min et al., 2003) de interés ganadero.

15. Efectos de los taninos sobre los rumiantes

La ingestión de taninos por parte de los rumiantes, presenta efectos beneficiosos y/o dañinos dependiendo de su concentración, estructura química, peso molecular, la especie animal implicada, su estatus y los componentes de la dieta (Makkar, 2003; Provenza et al., 2003).

En general, se acepta que mientras que los Taninos Hidrolizables pueden ser responsables de intoxicaciones severas y/ o mortales (Jean-Blain, 1998). Y, que el consumo moderado o bajo de Taninos Condensados tiene efectos positivos sobre la fisiología digestiva y la salud de los herbívoros (Aerts et al., 1999; Barry and Mc Nabb, 1999b), al contribuir a la mejora del rendimiento, la prevención de meteorismo, el aumento del flujo de aminoácidos hacia el intestino en rumiantes (Reed, 1995) y la eliminación de parásitos internos (Provenza and Villalba, 2010).

- *Efectos de los taninos hidrolizables*

Las intoxicaciones severas debidas a la ingestión de plantas ricas en THs, están asociados fundamentalmente a la presencia de galotaninos (Zhu et al., 1992; Reed, 1995; Butter et al., 1999; Norton, 1999; ; McSweeney et al., 2001; Makkar, 2003; Mueller-Harvey, 2006). La actividad de las bacterias presentes en el rumen, facilita la liberación de ácidos gálicos que son descarboxilados en pirogalol y convertidos a continuación, en resorcinol (Singh et al., 2001). Éstos metabolitos pasan al torrente sanguíneos y se caracterizan por ser hepato y nefro-tóxicos (Mueller-Harvey, 2006). Aún así, la toxicidad de los THs depende de la calidad (estructura química, peso molecular) y de la cantidad de THs ingeridos (Zhu et al., 1992; Frutos et al., 2004).

- *Efectos de los taninos condensados*

Los TCs en una concentración adecuada, protegen la proteína vegetal de la desaminación microbiana (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992), mejorando además, la respuesta inmune del hospedador (Coop and Kyriazakis, 1999) al incrementar la cantidad de proteínas y aminoácidos que son absorbidos a nivel intestinal (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992; Wang, et al 1996; Mueller-Harvey, 2006). Este aspecto se pone de manifiesto en el incremento en la excreción de nitrógeno fecal y la reducción de éste vía orina (Makkar, 2003; Mueller-Harvey, 2006). Sin embargo, los TCs también pueden formar complejos insolubles con las fibras vegetales, inhibiendo la actividad enzimática microbiana, además de producir astringencia (Kumar and Singh, 1984). Como consecuencia, podrían producir una menor palatabilidad en aquellas plantas que los contienen en cantidades elevadas (McLeod, 1974; Salunkhe et al., 1990; Harbone, 1993), evitando así el exceso de depredación (Jean-Blain, 1998; Bennick, 2002), de ahí la importancia de la dosis.

15.1. Efectos dependientes de la dosis

La ingesta de metabolitos secundarios por parte de los herbívoros, está asociada con efectos beneficiosos o bien perjudiciales dependiendo de la concentración y de la mezcla de metabolitos (Provenza et al., 2007). Esta acción dual toxina/medicina se debe fundamentalmente a la dosis y a las consecuencias que esto puede acarrear sobre la tolerancia y el estado fisiológico del animal (Plotkin,

2000; Provenza and Villalba, 2010). Los estudios realizados revelan que el consumo moderado de TCs, está asociado con efectos favorables, mientras que la ingestión de cantidades elevadas podría provocar efectos negativos sobre los parámetros zootécnicos, la fisiología digestiva y la salud de los animales (Aerts et al., 1999; Waterman, 1999; Mbhata et al., 2002; Hervás et al., 2003; Waghorn and Mc Nabb, 2003). La concentración de TCs en la dieta condiciona entonces, los efectos fisiológicos y metabólicos en el ganado. Una dieta con una concentración débil (<2% Materia Seca (MS)) muestra efectos débiles o ausentes sobre el hospedador; una concentración moderada (3-6% MS) efectos benéficos (ej. mejoras en el crecimiento, en la producción de lana y leche y mejora de la resiliencia) (Hoste et al., 2006). Finalmente, una concentración fuerte (>7% MS) efectos nefastos (Reed, 1995; Waghorn et al., 1994a; Waghorn et al., 1994b).

15.2. Efectos negativos de los taninos condensados

Al contrario que los THs, los TCs raramente están asociados a la toxicidad aguda en rumiantes (Butter et al., 1999), dado que por su gran peso molecular no pueden ser absorbidos por la mucosa gastrointestinal (Schofield et al., 2001a; Paolini et al., 2004). Sin embargo, un contenido excesivo de TCs en la dieta puede afectar al rendimiento, aunque, existen diferencias dependiendo del tipo TCs involucrados (Waghorn et al., 1998).

15.2.1. Reducción ingesta voluntaria

El consumo elevado de taninos se ha relacionado con la alteración de la ingesta voluntaria por el efecto astringente de su liberación, debido a la ruptura de las paredes celulares vegetales en el tracto digestivo. La baja palatabilidad, la baja tasa de evacuación fuera del rumen y los efectos tóxicos, son factores que podrían explicar este efecto en la ingesta voluntaria (Kumar and Singh, 1984; Provenza et al., 1995). También se citan efectos en la tasa de crecimiento, eficiencia energética y la digestibilidad de proteínas debido a la formación de complejos con las proteínas, almidón y enzimas digestivas y por el gasto energético que supone contrarrestar los efectos tóxicos (Silanikove et al., 1996; Provenza et al., 2003). Pese a todo, dichos fenómenos podrían modificarse controlando la cantidad de TCs presente en la dieta (Waghorn et al., 1987; Terrill et al., 1992a). Ésto se observa en estudios realizados con leguminosas de zonas templadas. Una concentración de TCs < 4.5% de la MS, parece no alterar la ingesta voluntaria (Waghorn et al., 1987; Terrill et al., 1992b). Y, en el caso de las plantas tropicales con concentraciones de TCs en hojas menor al 3% MS, no se produjeron alteraciones de la ingesta voluntaria en caprinos (Alonso-Díaz et al., 2008c), ovinos (Alonso-Díaz et al., 2009) o bovinos (Sandoval-Castro et al., 2005).

15.2.2. Efectos en la fisiología digestiva

El impacto de los TCs en la función intestinal en rumiantes no es del todo conocido, aunque los datos sugieren la inhibición enzimática. Los TCs libres se unen a enzimas endógenas, inhibiendo la actividad proteolítica, alterando la absorción intestinal (Waghorn, 2008). Igualmente, se han descrito alteraciones de la mucosa gástrica (Kumar and Singh, 1984; Reed, 1995) que favorecerían la absorción

de TCs y THs. Aunque a priori, debido a su gran peso molecular, los TCs no serían absorbidos en el tubo digestivo (Silanikove et al., 2001; Mueller-Harvey, 2006), grandes concentraciones de taninos alterarían el epitelio intestinal (Silanikove et al., 2001) favoreciendo la absorción de estos, con los consecuentes efectos tóxicos que eso supondría (McLeod, 1974). Se observan por ejemplo descamaciones y ulceraciones en corderos expuestos a fuerte dosis de quebracho (16% de la ración) (Hervás et al., 2003). En caprinos, el incremento de la dosis de TCs en la ración está asociado a un proceso de queratinización del epitelio digestivo (Mbata et al., 2002). Del mismo modo, se observa un incremento en el número de células inflamatorias y en la secreción de mucus (Hervás et al., 2003), éste último, asociado a la hiperplasia de las células de Goblet cuya función podría ser la protección intestinal, aunque en exceso, podría ralentizar el movimiento de los metabolitos a los enterocitos para su absorción (Waghorn, 2008).

A nivel sanguíneo se observa un descenso en la hemoglobina, así como un descenso medio de los glóbulos rojos y un incremento en los niveles séricos de bilirrubina. A nivel del rumen, la formación de complejos TC-proteína y fibra alimentaria reduciría la digestibilidad y comprometería la digestión de lípidos o ácidos grasos (Butter et al., 1999; Mueller-Harvey, 2006). No obstante, los efectos deletéreos están asociados con ingestiones masivas de TCs, que pueden perturbar la digestión ruminal y la reducción global de la actividad enzimática de la flora bacteriana (McSweeney et al., 2001).

15.3. Adaptaciones de los herbívoros a la toxicidad o baja palatabilidad

A lo largo de la evolución, los herbívoros han desarrollado diferentes mecanismos adaptativos fisiológicos y etológicos que les permite reducir el efecto dañino de los taninos (Ramos et al., 1998, Provenza et al., 1990; Provenza et al., 1995). Las estrategias alimentarias pastantes de los ovinos o ramoneadoras de los caprinos, condicionan su exposición a los taninos (Barry and Mc Nabb, 1999b), existiendo además, mecanismos que les permiten disminuir la toxicidad de los TCs, con diferencias interespecíficas observadas también en los trópicos (Alonso-Díaz et al., 2012).

En caprinos, la liberación de proteínas salivares ricas en prolina, ejercería un efecto detoxificador al formar complejos solubles tanino-proteína suavizando el impacto negativo (Jones and Mangan, 1977; Silanikove et al., 1996; Ramos et al., 1998). Igualmente, la presencia de tanasas de origen microbiano a nivel del rumen, que ejerce una actividad detoxificadora (Aerts et al., 1999). En el caso de los ovinos, las adaptaciones fisiológicas se producen tras un periodo de tiempo consumiendo forrajes ricos en proantocianidinas (Aerts et al., 1999). A nivel de suero sanguíneo, se observa un incremento de los niveles de hormona de crecimiento (Barry et al., 1986), lo que contribuiría a la retención de nitrógeno (Muir et al., 1983) mejorando el metabolismo de las proteínas (Aerts et al., 1999).

Por este motivo, el animal dedicaría gran parte de su tiempo a la selección de especies vegetales tanto por su valor nutritivo como por su menor toxicidad (Ramos et al., 1998) de ahí, las diferencias encontradas en el comportamiento de caprinos y ovinos (Alonso-Díaz et al., 2012).

15.4. Efectos beneficiosos

Como ya vimos, el consumo de plantas ricas en taninos, tiene atribuidos efectos contradictorios en la fisiología de los rumiantes, puesto que se les atribuyen efectos positivos en la tasa de crecimiento animales, pero también podría provocar la muerte de los mismos (Butter et al., 1999). En términos generales, los beneficios de los TCs, estaría asociado al efecto sobre la digestión y absorción de nutrientes, al reducir la cantidad de proteínas que son degradadas por los microorganismos del rumen, aumentándose la cantidad de aminoácidos que pueden ser absorbidos a nivel intestinal. Se disminuye así, los costes de la producción de urea en pro de mejoras en el rendimiento animal.

15.4.1. Efectos nutricionales: sobre la digestión de los alimentos y la nutrición animal

- Masticación

Durante la masticación se produce la ruptura del 60% de las células vegetales, los TCs son liberados pudiéndose unir a proteínas salivales, proteínas vegetales, polisacáridos, metales y proteínas de la pared celular (Ramos et al., 1998; Mueller-Harvey, 2006). Así mismo, una parte queda en forma de TCs libres (Hofmann, 1989; Ramos et al., 1998). Todo ello provoca una reducción en la proporción de proteína soluble en la ingesta, ralentizando la tasa de degradación proteica. La producción de la saliva producida por las glándula parótidas durante la ingestión es elevada, siendo proporcionalmente mayor en las especies ramoneadoras (Alonso-Díaz, 2012; Vargas-Magaña, 2013). Si la saliva contiene además, grandes cantidades de proteínas ricas en prolina, la tolerancia a los TCs es mayor, dada la alta capacidad para formar complejos Prolina-TC (Alonso-Díaz et al., 2012; Vargas-Magaña et al., 2013).

- Efectos sobre las fermentaciones intra-ruminales

Durante las fermentaciones ruminales, la mayor parte de la proteína alimentaria es convertida en amoníaco por los microorganismos del rumen. Después es absorbido, convertido en urea en el hígado y posteriormente eliminado a través de la orina (Zimmer and Cordesse, 1996; Jean-Blain, 1998; Aerts et al., 1999; Theodorou et al., 1999; Min et al., 2003). Gracias al pH del rumen (6-7 neutro), pueden formarse complejos estables TC-proteína (Aerts et al., 1999; Butter et al., 1999) o bien la fijación de los TCs a las enzimas bacterianas, reduciéndose globalmente la proteólisis ruminal (Zimmer and Cordesse, 1996; Jean-Blain, 1998; Aerts et al., 1999; Theodorou et al., 1999; Min et al., 2003). Esto favorece la reducción de la excreción de metano y amoníaco por parte de los rumiantes (Mc Nabb et al., 1993; Aerts et al., 1999; Theodorou et al., 1999; Hess et al., 2006a; Hess et al., 2006b; Animut et al., 2008), mejorando el rendimientos animal (Waghorn, 2008).

- Aumento de la proteínas a nivel intestinal (Efectos post-ruminales)

Como ya vimos, los TCs pueden viajar a través del tracto gastrointestinal de forma libre o en complejos tanino-proteína. Los taninos libres, pueden ser absorbidos o degradados a su paso por el sistema. Los complejos tanino-proteína, alcanzan el abomaso, donde el efecto del pH (2,5-3,5) facilita su

disociación (Aerts et al., 1999). Se aumenta por tanto el flujo de proteínas hacia el intestino (pH 8-9) y por consecuencia, la absorción de aminoácidos (McNabb et al., 1996; Zimmer and Cordesse, 1996; Barry and Mc Nabb, 1999a; Butter et al., 1999; Theodorou et al., 1999; McSweeney et al., 2001; Makkar, 2003; Min et al., 2003; McSweeney et al., 2008; Waghorn, 2008). Todo ello favorecerá el potencial de crecimiento de los rumiantes (Balic et al., 2000a; Balic et al., 2000b; Coop, 2001), que se deposita en carne, lana y leche, limitando los niveles de nitrógeno excretados y con ello, la contaminación de suelos y agua (Aerts et al., 1999). Así mismo, toda suplementación proteica en el organismo contribuirá a la mejora de la respuesta inmunitaria del hospedador frente a los vermes (Balic et al., 2000a; Balic et al., 2000b; Coop and Kyriazakis, 2001).

15.4.2. Efectos sobre la salud: prevención del meteorismo

El consumo de TCs contribuye a la prevención del meteorismo (Ramírez-Restrepo and Barry, 2005; Rochfort et al., 2008; Waghorn, 2008). El meteorismo espumoso, es un desorden digestivo de los rumiantes que afecta mayoritariamente al rumen y al retículo. Se produce por la acumulación de gas procedente de la fermentación, responsable de la formación de una espuma que perturba la digestión. Este fenómeno está ligado a una ingestión elevada de sustancias fermentables (carbohidratos y proteínas), que favorece una elevada actividad metabólica de la flora bacteriana ruminal, liberando metano como producto (Dougherty, 2010; Merck and Dohme, 2011). Es una alteración de la salud muy común, que disminuye la productividad (carne y leche), al reducirse la ingesta voluntaria de alimento (Hoste et al., 2012) y que es responsable del incremento de la mortandad del ganado. Su incremento en las últimas décadas puede deberse al manejo y a las prácticas alimentarias realizadas (Zimmer and Cordesse, 1996; Waghorn and Mc Nabb, 2003), aunque, el consumo de plantas ricas en taninos condensados en una concentración del 0.5% en la dieta, parecen prevenir este fenómeno (Hoste et al., 2012). El establecimiento de complejos tanino-proteína, protege las proteínas de la degradación ruminal, limitando las fermentaciones ruminales y por tanto disminuyendo el riesgo de meteorismo (Zimmer and Cordesse, 1996; Waghorn and Mc Nabb, 2003; Waghorn and Mc Nabb, 2003).

16. Efectos antihelmínticos de los taninos condensados

La inclusión de nutraceuticos en el tratamiento de los NGIs, se basa en los conocimientos previos que se tienen, sobre forrajes conocidos por sus valores nutritivos (Niezen et al., 1995; Niezen et al., 1998b; Waller and Thamsborg, 2004) en (Hoste et al., 2012), con el objetivo de desarrollar un método de control de los NGIs más sostenible (Waller, 2006a).

La mayoría de efectos AH asociados al empleo de nutraceuticos se han obtenidos de plantas ricas en polifenoles y más concretamente en taninos, dentro de las que se incluyen 1) Leguminosas de regiones templadas, 2) Plantas mediterráneas, 3) Leguminosas tropicales, 4) Subproductos (algarroba). Sin embargo los resultados más prometedores para su aplicación en condiciones ganaderas, se asocian al consumo de forrajes ricos en taninos (Manolaraki et al., 2010; Hoste et al., 2011). Dentro de los cuales parecen destacar las plantas de la familia Fabacea de regiones templadas y tropicales, más concretamente algunas leguminosas forrajeras como: zulla, cuernecillo (*Lotus corniculatus* y *Lotus pedunculatus*), el trébol chino y esparceta (Hoste et al., 2011) como se describe más adelante.

Los primeros pasos para la validación de las propiedades AHs de plantas ricas en taninos, se obtienen a través de tests “*in vitro*” focalizados en etapas clave del ciclo biológico de los vermes, cuyos resultados han de ser posteriormente validados “*in vivo*”.

En las siguientes líneas se describen los resultados obtenidos “*in vitro*” e “*in vivo*”.

16.1. Ensayos *in vitro*

Los test *in vitro* suponen una primera etapa en la investigación de las propiedades AHs de plantas ricas en taninos. Permiten evaluar la eficacia y determinar el papel de los TCs u otros metabolitos secundarios de naturaleza polifenólica sobre los NGIs. Los objetivos de los test *in vitro* son 1) Investigación de la naturaleza y concentración de moléculas activas (TCs y polifenoles) relacionadas con los efectos AHs. 2) Comprensión de los mecanismos de acción sobre diferentes etapas clave de los NGIs (Jackson, 2010; Hoste et al., 2012). Se realizan a partir de concentraciones de TCs que pueden ser testadas *in vivo* (Terrill et al., 1994; Molan et al., 2003b). Aunque no pueden ser considerados una herramienta predictiva de los efectos AHs *in vivo*, puesto que en este caso, los factores fisiológicos e inmunológicos del hospedador podrían condicionar los resultados esperados.

Para los ensayos *in vitro* existen test variados, según la etapa del ciclo biológico de los parásitos, adaptados a partir de técnicas para el test *in vitro* de las drogas sintéticas (Tabla 6).

Tabla 6. Clasificación Test *in vitro*, etapas clave del ciclo a las que van dirigidos y efectos en la biología de los Nematodos gastrointestinales (NGIs).

Test	Etapas del Ciclo	Efectos en la biología de los NGIs
Egg Hatch Assay (EHA)	Huevos	Impacto en la eclosión de huevos
Larval Development Assay (LDA)	Huevos a (L3)	Inhibición del desarrollo larvario
Larval Feeding Inhibition Assay (LFIA)	L1 L2	Inhibición de la alimentación larvaria
Larval Migration Inhibition Assay (LMIA)	(L3)	Inhibición de la motilidad de las larvas (L3)
Larval Exsheathment Inhibition Assay (LEIA)	(L3)-L3	Inhibición del proceso de desenvaine (L3)
<i>In vitro</i> direct challenge (IVDC)	L3	Inhibición del establecimiento de las larvas L3
Adult Motility Inhibition Assay (AMIA)	L5 Adultos	Motilidad y viabilidad de los vermes adultos

16.2. Ensayos *in vivo*

Los ensayos *in vivo* permiten testar y confirmar los resultados obtenidos *in vitro*, considerando los posibles factores que pueden interaccionar (hospedador; especie; parasítica; recurso testado (planta, etc.).

Hasta el momento, destaca *in vitro* el potencial AH de la familia de las Fabáceas, confirmado también *in vivo*, de algunas leguminosas forrajeras o pastos, ricos en taninos en diferentes aéreas climáticas: zulla (*Hedysarum coronarium*) (Niezen et al., 1995; Niezen et al., 1998a; Niezen et al., 2002b), cuernecillo (*Lotus pedunculatus* y *L. corniculatus*) (Niezen et al., 1993; Niezen et al., 1998b; Marley et al., 2003; Heckendorn et al., 2007); el trébol chino (*Sericea lespedeza* y *Lespedeza cuneata*) (Min et al., 2004; Min et al., 2005; Shaik et al., 2006; Terrill et al., 2007; Terrill et al., 2009) o esparceta (*Onobrychis viciifolia*) (Paolini et al., 2003b; Paolini et al., 2005a; Heckendorn et al., 2006; Brunet et al., 2007; Heckendorn et al., 2007; Manolaraki et al., 2010). En climas tropicales, el árbol leguminoso tropical Tzalam (*Lysiloma latisiliquum*) ha sido una de las especies cuya actividad AH ha sido estudiada (Brunet et al., 2008b; Martínez-Ortiz-De-Montellano et al., 2010).

Las experiencias *in vivo* con ovinos y caprinos, han permitido deducir los efectos potenciales del consumo de algunas leguminosas forrajeras ricas en taninos, sobre diferentes etapas del ciclo biológico de los vermes observándose:

1. Un descenso significativo en la tasa de establecimiento de las larvas (L3) en condiciones experimentales (Paolini et al., 2003b; Lange et al., 2006; Brunet et al., 2008b), contribuyendo a reducir el nivel de infección en el hospedador.
2. Un descenso en la tasa de excreción de huevos máxima, de hasta el 80% en infecciones patentes, contribuyendo a disminuir la contaminación de los pastos (Lange et al., 2006; Terrill et al., 2009; Manolaraki et al., 2010). Que, dependiendo del forraje explotado y de las especies de nematodos puede estar asociado con: a) Un descenso significativo en el número de vermes (Heckendorn et al., 2006; Lange et al., 2006; Shaik et al., 2006; Heckendorn et al.,

2007) o bien b) Con la reducción de la fertilidad de las hembras (Paolini et al., 2005a; Manolaraki et al., 2010; Martínez-Ortíz-De-Montellano et al., 2010).

3. Respecto a los efectos sobre el desarrollo de los huevos hasta L3, existen test *in vitro* que sugieren un retraso o descenso en el desarrollo así como un descenso en la motilidad de las larvas (Molan et al., 2000b; Hoste et al., 2011).

16.3. Factores potenciales implicados

A diferencia de los AHs químicos, el empleo de los nutracéuticos tiene como principal efecto la regulación de la biología de los vermes, más que un efecto letal en sí mismo. No obstante, existen gran variabilidad de resultados dependiendo de los estudios, por lo que se cree que existen numerosos factores que podrían estar implicados (Hoste et al., 2011), como: especies parasíticas implicadas y su localización anatómica, hospedador y así como los recursos taniníferos explotados/empleados.

16.3.1. Dependientes de la especie parasítica y su localización anatómica

Algunos autores sugieren que la localización anatómica en el hospedador, de las especies produce efectos divergentes (Hoste et al., 2011). Los resultados obtenidos tras los experimentos *in vivo* en caprinos y ovinos que recibieron la misma fuente de taninos, sugieren diferencias en cuanto al impacto en las especies implicadas (Hoste et al., 2011). Por ejemplo, en ovinos, se observa un descenso efectivo en la reducción del número de adultos de *H. contortus* y en la fecundidad de *Cooperia curticei* para esparceta (Heckendorn et al., 2006). En caso de fuentes purificadas de taninos, como el quebracho, el impacto sobre las especies intestinales parece ser más evidente, que en el caso de las abomasales (Athanasiadou et al., 2001). Mientras que en caprinos, el quebracho reduce la fecundidad y el número de vermes de *T. colubriformis*, *T. circumcincta* o *H. contortus* (Paolini et al., 2003b; Paolini et al., 2003c). En el caso de *Sericea lespedeza*, parece ser eficaz en la reducción en el número de vermes de *H. contortus*, *T. colubriformis* y *T. circumcincta* (Molan et al., 2002). Ante la heterogeneidad de los resultados, parece probable que la localización anatómica de los vermes tenga un papel relevante (Hoste et al., 2011), si consideramos las condiciones fisiológicas de cada órgano diana y las propiedades físico/químicas de los metabolitos secundarios en cuestión. Todo ello tendría validez si se asume, que la unión tanino-proteína es pH-dependiente (Mueller-Harvey, 2006), por lo que la disponibilidad de los taninos para interaccionar con los nemátodos estaría condicionada (Hoste et al., 2011) por, entre otros, el pH de las distintas regiones del tracto digestivo.

16.3.2. Factores dependientes de la etapa del ciclo biológico de los Nematodos gastrointestinales

Las experiencias realizadas hasta el momento con algunos forrajes ricos en taninos confirman el efecto de los taninos condensados en algunas de las etapas del ciclo biológico de los vermes:

- a) Inhibición *in vitro* del desarrollo de los huevos de *T. colubriformis* hasta L1 y L3, mediante *H. coronarium* y *L. pedunculatus* (Molan et al., 2000a; Molan et al., 2000b).

b) Perturbaciones en la instalación de las L3, por: b1) Inhibición del desenvaine (exsheathment) de las (L3) para la esparceta (*O. vicifolia*) y taninos condensados (Brunet and Hoste, 2006; Brunet et al., 2007; Brunet et al., 2008b; Manolaraki et al., 2010) y/o b2) Perturbación de la penetración de las L3 en las mucosas del hospedador impidiendo alcanzar los siguientes estadios (Brunet et al., 2008a; Brunet et al., 2011; Hoste et al., 2012).

c) Efectos en la migración larvaria, tras el contacto con extractos de plantas mediterráneas (Manolaraki et al., 2010).

d) Cambios en la ultraestructura de las (L3s) y L3s observados por MEB (Brunet et al., 2011), que explicaría la alteración observada *in vivo* en el establecimiento de las larvas L3 en caprinos (Paolini et al., 2003c; Brunet et al., 2008b).

Respecto a los efectos en la fase adulta, las experiencias realizadas *in vitro*, resaltan:

a) Efectos en la motilidad de los vermes *T. colubriformis* y *H. contortus* (Paolini et al., 2004; Paolini et al., 2005) para la esparceta.

In vivo, se observa una reducción de la fertilidad de las hembras y la tasa de excreción de huevos tras el contacto con quebracho (Paolini et al., 2003a), esparceta (Martínez-Ortíz-De-Montellano et al., 2010), algunas plantas forrajeras mediterráneas ricas en taninos (Manolaraki et al., 2010) y plantas tropicales como el tzalam (Martínez-Ortíz-De-Montellano et al., 2010), sin que se aprecie una alteración en el número de vermes.

A pesar de los resultados esperanzadores obtenidos para la esparceta y el tzalam de zonas templadas y tropicales respectivamente (Hoste et al., 2012), la información de la que se dispone sobre los mecanismos de acción de los metabolitos secundarios sobre los vermes adultos es escasa. Esto es debido fundamentalmente, a que la recreación *in vitro* de las condiciones que tienen lugar en los hospedadores es un factor limitante. Por este motivo se plantea la presente tesis, en cuyos objetivos e hipótesis de trabajo se profundizará en las siguientes páginas.

16.3.3. Factores Dependientes del hospedador

Los efectos AHs de los taninos condensados han sido estudiados en ovinos, bovinos y caprinos con resultados heterogéneos. Para comprenderlo es preciso tener en cuenta el comportamiento alimentario asociado. Bovinos y ovinos se comportan como pastoreadores, mientras que los caprinos son considerados ramoneadores. Estos presentan adaptaciones interespecíficas a la ingesta de plantas ricas en metabolitos secundarios y/o taninos, con una mayor o menor capacidad para contrarrestar los efectos negativos (Ver Apartado 15.3.). Ello explicaría las diferencias encontradas en la eficacia de los forrajes ricos en taninos entre corderos y caprinos (Calderón-Quintal et al., 2010; Hoste et al., 2011), dado que las diferencias morfológicas, fisiológicas y comportamentales permiten diferentes formas de hacer frente a los potenciales tóxicos (Provenza et al., 2003; Papachristou et al., 2005; Villalba et al., 2006). Así mismo la localización geográfica de los hospedadores y el grado de exposición a fuentes de taninos parece que podría condicionar la susceptibilidad a los TCs (Calderón-Quintal et al., 2010).

Hasta ahora, existen tan solo un número reducido de experiencias que permitan comparar ovinos y caprinos. En ovinos, se observa un descenso efectivo en la reducción en el número de vermes adultos (Heckendorn et al., 2006) mientras que en el caso de las caprinos, parece estar asociado con el descenso en la fertilidad de las hembras y la producción de huevos (Paolini et al., 2003a; Paolini et al., 2003c; Paolini et al., 2005a).

16.3.4. Dependientes de la especie vegetal y/o recursos taniníferos empleados

La investigación de plantas ricas en taninos, se ha realizado en torno a plantas de regiones templadas, mediterráneas (Osoro et al., 2007, Hoste et al., 2009) y tropicales (ej. *Leucaena leucocephala* (Ademola and Idowu, 2006; Alonso-Díaz et al., 2008a; Alonso-Díaz et al., 2008b), varias especies de *Acacia spp* (Kahiya et al., 2003; Cenci et al., 2007; Akkari et al., 2008; Alonso-Díaz, et al., 2008a; Alonso-Díaz, et al., 2008b), yuca (*Manihot esculenta*) (Sokerya, 2009) y numerosas especies de plantas ramoneadas mexicanas (Alonso-Díaz et al., 2008a; Alonso-Díaz et al., 2008b).

Las variaciones en los resultados obtenidos sobre los NGIs han sido atribuidas a la planta consumida, donde los factores cuantitativos y cualitativos que afectan a los metabolitos secundarios y particularmente a los taninos, podrían ser los responsables de esta variabilidad (Manolaraki, 2011). A nivel cuantitativo, relacionado con la dependencia significativa de la dosis empleada y a nivel cualitativo en relación a los TCs, así como otros metabolitos secundarios potencialmente implicados (Ver revisión (Hoste et al., 2012)).

Los resultados obtenidos: 1) Confirman el efecto de los TCs en diferentes estadios del ciclo biológico de los parásitos, como huevos, inhibición de la alimentación larvaria o motilidad de L3 (Molan et al., 2000a; Molan et al., 2003a; Molan et al., 2003b; Paolini et al., 2004; Barrau et al., 2005) en las principales especies de NGIs: *H. contortus*, *T. colubriformis* y *T. circumcincta*. 2) Constatan el papel AH de los taninos, como se demuestra tras la adición de polietilenglicol (PEG) o polivinilpirrolidona (PVPP). Ambos, inhibidores de la acción de los taninos por su capacidad de establecer enlaces con los grupos fenólicos y provocar su precipitación (Jones, 1965). Y respecto a las plantas tropicales testadas, los ensayos realizados con extractos de *Leucaena leucocephala*, muestran una interferencia en el desarrollo de larvas de *H. contortus* (Ademola and Idowu, 2006). Igualmente, se ha comprobado, la alteración en la migración y desenvaine de L3 de *H. contortus* frente a extractos de *L. leucocephala* y *Lysiloma latisiliquum* (Alonso-Díaz et al., 2008a; Hoste et al., 2012). Sin embargo, conviene resaltar que algunos autores señalan la capacidad de estas sustancias para establecer enlaces con otros grupos fenólicos y polifenoles en general (Doner et al., 1993; Makkar et al., 1995).

16.4. Posibles mecanismos de acción

Los conocimientos sobre los efectos sobre los NGIs son todavía escasos. Aún así, los ensayos *in vitro* e *in vivo* se han articulado sobre dos hipótesis principales no excluyentes entre sí, en torno a los efectos directos e indirectos. Así, se propone la existencia de un efecto directo de los TCs sobre los parásitos, dependiente de la concentración utilizada y de la etapa del ciclo biológico. De forma indirecta, se produciría un incremento en la cantidad de proteínas que es absorbida por parte del hospedador (Reed, 1995; Aerts et al., 1999; Min and Hart, 2003) que contribuiría a la mejora de la respuesta inmune frente a las infestaciones gastrointestinales (Niezen et al., 2002a).

16.4.1. Efectos directos

La hipótesis directa, se basa en los efectos directos o farmacológicos de los polifenoles, evidenciados en los test *in vitro* e *in vivo*, tras las exposición a corto plazo a plantas ricas en metabolitos secundarios (Athanasiadou et al., 2001; Brunet et al., 2008b; Hoste et al., 2012). Los taninos condensados se unirían a las proteínas presentes en la cutícula del parásito. Ésta es rica en prolina e hidroxiprolina y se encuentra cubriendo no solo el cuerpo del nematodo, sino también su cavidad bucal, el esófago, la cloaca y la vulva (Thompson and Geary, 1995). Esta propiedad sería la responsable de las alteraciones estructurales observadas *in vitro*, afectando a la nutrición, produciendo un descenso en la fecundidad de las hembras adultas y la reducción en la excreción de huevos (Niezen et al., 1995; Niezen et al., 1998a; Athanasiadou et al., 2001; Paolini et al., 2003b; Brunet et al., 2008b; Martínez-Ortíz de Montellano et al., 2009). Igualmente, existen evidencias de que, dependiendo del estadio de desarrollo del nematodo, la especie, la concentración de extracto y el tiempo de exposición, los efectos antihelmínticos serán variables (Paolini et al., 2003c; Paolini et al., 2004; Bahuaud et al., 2006).

16.4.2. Efectos indirectos

La hipótesis de efectos indirectos, se relaciona con los efectos indirectos que se producirían en la modulación de la biología de los vermes, como consecuencia de una mejora de la respuesta inmune del hospedador (Kahn and Díaz-Hernández, 2000). Se producirían efectos nutricionales e inmunológicos en el hospedador, tras la unión de los taninos a proteínas de la dieta, protegiéndolas de la degradación ruminal. Se aumentaría por tanto, la cantidad de proteína que alcanza el intestino del hospedador y que puede ser absorbida (Coop and Kyriazakis, 1999; Min and Hart, 2003), así como de aminoácidos a nivel intestino delgado. Éste mayor aporte proteico repercutiría en el sistema inmune del hospedador, aumentando el número de células inflamatorias (Paolini et al., 2003a), suponiendo una mejora de la resiliencia y con ello de la resistencia (Hoste et al., 2006) frente a los vermes.

Existen tan solo unos pocos estudios que examinan la hipótesis indirecta a través de la evaluación del número de células efectoras (eosinófilos, mastocitos, glóbulo-leucocitos y células de Goblet) en la mucosa digestiva de corderos (Tzamaloukas et al., 2006; Rios-De Alvarez et al., 2008; Martínez-Ortíz-De-Montellano et al., 2010) o en cabras (Paolini et al., 2003a; Paolini et al., 2003c), tras el consumo de recursos ricos en taninos. Las evidencias más convincentes provienen de (Tzamaloukas et al., 2006) con corderos pastadores de zulla o chicoria (*Cichorium intybus*), que mostraban un descenso en el

desarrollo de los vermes, asociado a un aumento en el numero de mastocitos y glóbulo-leucocitos. No obstante, los resultados y conclusiones obtenidos en otros estudios no parecen ser tan convincentes como aquellos relacionados con la hipótesis directa (Hoste et al., 2012).

17. Plantas y recursos taniníferos testados

Los recursos taniníferos empleados en la presente tesis fueron seleccionados por su contenido en TCs y por el interés respecto a su actividad AH. Para ellos se seleccionaron leguminosas de climas templados: esparceta y subproductos del algarrobo de aplicación agroindustrial, leguminosas de climas tropicales: tzalam y extracto de quebracho, como fuente purificada de taninos, así como diversos flavonoides comerciales purificados.

17.1. Familia Leguminosae

La familia Leguminosae (Fabaceae) incluye árboles, arbustos, sufrútices y hierbas anuales o perennes. Es una de las familias más grandes de las Angiospermas, con aproximadamente 700 géneros y 18000 especies. Todas las especies son fijadoras de nitrógeno atmosférico gracias a la presencia de la bacteria del *Rhizobium* sp., localizadas en nódulos a nivel radicular, que contribuyen a incrementar la fertilidad de los suelos. Por sus características han sido empleadas como plantas forrajeras (Talavera et al., 1999).

17.1.1. De climas templados

- Esparceta (*Onobrychis viciifolia* Scop)

El pipirigallo o esparceta (Laguna Lumbreras, 1997; Valdés, 2006) es una leguminosa perenne (Allen and Allen, 1981) que crece sobre substratos calcáreos, como planta semi-natural sin necesidad de ninguna fertilización (Muller, 2002). Presenta un contenido en TCs concentrados fundamentalmente, en las hojas, aunque también pueden encontrarse en raíces (Lees et al., 1995), pero en menor concentración (Goplen et al., 1980; Foo et al., 1982; Koupai-Abyazani et al., 1992). Presenta polímeros de proantocianidinas como leucocianidín y leucodelphinidines en frutos maduros e inmaduros, hojas, corteza y floema, también isoflavonas y glicósidos fenólicos, entre otros (Humphries et al., 2006).

Es considerada una de las leguminosas forrajeras con efectos AHs contras los NGIs. Asociada a su actividad AH parecen estar los TCs y otros compuestos fenólicos (3-flavon glicósidos) (Barrau et al., 2005). Posee una alta palatabilidad en caprinos y ovinos, así como, se considera que tiene efectos positivos sobre la prevención del meteorismo en rumiantes (Brunet et al., 2007). Puede consumirse seco o ensilado que parece tener una mayor efectividad que fresco, según estudios *in vitro* frente a (L3s) de *H. contortus* (Ojeda-Robertos et al., 2010). Se han constatado efectos antiparasíticos contra NGIs en cabras y ovejas, concretamente en la reducción en la excreción de huevos (Paolini et al., 2003b; Thamsborg et al., 2003), asociada a una disminución de la fecundidad de las hembras de *H. contortus*. Estudios realizados *in vitro* confirman que los extractos podrían tener un efecto inhibitor sobre la motilidad de L3 de diferentes especies de NGIs (Molan et al., 2000b; Molan et al., 2004; Paolini et al., 2004). Ensayos recientes demuestran alteraciones en el proceso de desenvaine de L3 en *H. contortus* y *T. colubriformis*, asociadas a una concentración creciente de extracto, viéndose restaurado el proceso tras la adición de PEG a los extractos de esparceta. Estos efectos parecen confirmarse en ensayos *in vivo* en ovejas canuladas alimentadas con esparceta (Brunet et al., 2007).

En caprinos alimentados con esparceta, se observa un descenso significativo en la tasa de excreción de huevos (Paolini et al., 2003b). Dichos resultados podrían estar asociados a un descenso en la fertilidad de las hembras, pero no puede confirmarse un efecto sobre la reducción en el número de vermes en el hospedador (Paolini et al., 2005b). En cualquier caso, los resultados varían en función de la etapa del ciclo biológico de los vermes (Paolini et al., 2005b), así como de la especie de nematodo (Paolini et al., 2005a).

- Algarrobo (*Ceratonia siliqua* L. Sp.)

Es una especie nativa de la región mediterránea (Ortiz, 1999), introducida en otras zonas templadas del mundo como California, México, Chile, Sudáfrica y Australia, gracias a su profundo sistema radicular que le permite adaptarse a diferentes suelos y condiciones de salinidad (Obeidat et al., 2011). *C. siliqua* es rica en flavones, concretamente C-glicosiflavones en los cotiledones, polifenoles en las vainas, así como proantocianidinas, elagitaninos y galotaninos. Las hojas de algarrobo son ricas en taninos y parecen no provocar efectos tóxicos en caprinos (Silanikove et al., 1996). Los frutos verdes muestran una baja palatabilidad debido al efecto astringente (Salunkhe et al., 1990), mientras que, cuando alcanzan la madurez el efecto disminuye, probablemente debido a la condensación y polimerización de los TCs (Tamir et al., 1971). Los frutos son ricos en azúcares (40-60%), con bajo nivel de proteínas (3-4%) y un 0.4-0.8% de lípidos, así como gran contenido en fibra y polifenoles (Marakis, 1996), siendo una fuente importante de polifenoles no- extractables (Bravo, 1998). Las experiencias con subproducto de algarrobo (pulpa), en corderos, mostraron una buena palatabilidad y consumo voluntario (Priolo et al., 1998). Ensayos con caprinos jóvenes alimentados con polvo del fruto de algarrobo incorporado a la dieta, presentaron menores rendimientos en la eficiencia de ganancia de peso, pero una ingesta voluntaria superior a los grupos control (Silanikove et al., 2006). Aunque son escasos los estudios realizados sobre los efectos AHs del algarrobo, recientemente, extractos de *C. siliqua* fueron testados *in vitro*, arrojando resultados significativos en el test de inhibición de la motilidad de larvas (LMI) de *H. contortus*. *In vivo*, en corderos alimentados con polvo de vaina de algarrobo, se observa una tendencia al descenso en la excreción de huevos para *T. colubriformis*, así como una importante reducción en el número de vermes. En el caso de *H. contortus*, se observa un descenso en el número de huevos contenidos en el útero, respecto al grupo control (Manolaraki et al., 2010). Dados estos resultados, surgió nuestro interés en profundizar en el conocimiento de los efectos del algarrobo.

17.1.2. De climas tropicales o subtropicales

- Tzalam (*Lysiloma latisiliquum* L. Benth.)

Las áreas tropicales y subtropicales poseen un número significativo de plantas nativas ricas en taninos, algunas de ellas empleadas como forrajes en la alimentación del ganado. El tzalam o salám, es un árbol tropical, común en América Central, cuyas hojas presentan un alto contenido en taninos (Sandoval-Castro et al., 2005; Alonso-Díaz et al., 2008b). Posee un contenido en TCs de 4,7% y una actividad biológica de 7.9 por gramo de extracto (Alonso-Díaz et al., 2008b), lo que indica una posible efectividad AH en ganado caprino (Alonso-Díaz et al., 2008a) y ovino (Alonso-Díaz et al., 2009), sin aparente toxicidad tras su consumo (Alonso-Díaz et al., 2008c) y sin alteraciones aparentes de la ingesta voluntaria (Alonso-Díaz et al., 2008c; Brunet et al., 2008b). Del mismo modo, incubaciones *in vitro* con extractos de *L. latisiliquum*, revelan efectos sobre la motilidad y desvaine de larvas (L3), de *H. contortus* (Alonso-Díaz et al., 2008a) y *T. colubriformis* (Alonso-Díaz et al., 2008b). Dichos resultados se confirman *in vivo*. Ensayos en cabras que consumieron tzalam, mostraron un descenso significativo en el establecimiento de ambas especies de parásitos (Brunet et al., 2008b). Estudios posteriores revelaron un descenso en la fertilidad de las hembras y en la talla de los vermes, aunque el número total de adultos no parecía verse afectado (Martínez-Ortiz-De-Montellano et al., 2010). La adición de polietileno-glicol (PEG) parece confirmar la acción AH, al incrementarse de nuevo los valores de establecimiento para las dos especies (Brunet et al., 2008). Confirmando los resultados obtenidos con la esparceta (*O. vicifolia*) y en ovejas alimentadas con *A. cyanophylla* (Akkari et al., 2008). Por estos motivos, podría considerarse una medida alternativa en el control antihelmíntico para las regiones tropicales y subtropicales.

17.2. Fuentes purificadas de taninos

- Quebracho (*Schinopsis* spp.)

El extracto de la corteza de varias especies del género *Schinopsis* spp., representa una de las mayores fuentes comunes de taninos condensados del mercado (Streit and Fengel, 1994). Contiene un 73% de taninos, 19% de otros fenoles y un 8% de agua (Athanasidou et al., 2000a) y se comercializa en forma de polvo fino soluble en agua a 40-45 °C (Athanasidou et al., 2001). La dosis se obtiene por dilución en agua, a una temperatura máxima de 80°C para evitar la inactivación de los taninos (Larrauri et al., 1997). Se administra oralmente junto con una dieta adecuadamente equilibrada, de modo que generalmente, representa un 5% de la misma, debido a que mayores concentraciones pueden producir efectos tóxicos (Reed, 1995). Experimentos *in vitro*, reflejan efectos AHs del quebracho en la viabilidad de larvas expuestas al extracto (Athanasidou et al., 2001). *In vivo*, se observa una reducción en la excreción de huevos por gramo de heces y en la fertilidad de las hembras, en corderos (Athanasidou et al., 2000b) y en caprinos (Paolini et al., 2003a). *In vivo*, igualmente, se observan diferencias significativas que no fueron detectados *in vitro*, en la susceptibilidad de las distintas especies de estrongilos, siendo las especies intestinales (*T. colubriformis* y *N. battus*) más afectadas que las

abomasales (*H. contortus* y *T. circumcincta*) (Athanasiadou et al., 2001). Fenómeno también observado en caprinos (Paolini et al., 2003c; Paolini et al., 2005b).

Del mismo modo, se considera que contribuye a la mejora de la respuesta inmune del hospedador frente a la infección, favoreciendo la disminución en el establecimiento de los vermes. Sin embargo, es necesario considerar los efectos nocivos de la ingesta de quebracho en concentraciones elevadas (Hervás et al., 2003), ya que podría reducir la digestibilidad del alimento y provocar diarreas severas, debidas a las grandes concentraciones de taninos presentes (Landau et al., 2000; Athanasiadou et al., 2001).

RESULTADOS

RESULTS

HIPOTESIS Y OBJETIVOS / HYPOTHESIS AND AIMS

El presente trabajo se centra en la evaluación de la hipótesis Directa, que hace referencia a los efectos directos de los taninos condensados y polifenoles, sobre los nematodos gastrointestinales a través de enlaces tanino- proteína. Atendiendo a la premisa de la existencia de un efecto directo, se pretende comprender mejor los mecanismos de acción de distintas fuentes ricas en taninos (RTs) en la comunidad parasitaria adulta del tracto gastrointestinal de pequeños rumiantes. Se tratará de confirmar igualmente, la existencia de un efecto a nivel poblacional dependiente de la localización anatómica de los vermes, tipo de recurso taninífero empleado y del tiempo de exposición al mismo. Todo ello se pondrá en evidencia a través de la observación de los cambios estructurales en vermes adultos, asociados a la esparceta y tzalam mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) *in vitro* e *in vivo* (Artículo 1). Así como los cambios funcionales en el nematodo de vida libre *C. elegans* (Artículo 2). Ésta experiencia además tendrá como objetivo el desarrollo de un modelo de laboratorio con el que evaluar los efectos funcionales (fertilidad de las hembras) de diversos polifenoles. Se desea de igual modo, comparar la variabilidad de efectos tras el consumo de recursos taniníferos, dependiendo de la localización anatómica de los vermes, tomando como referencia *Haemonchus contortus* (abomasum) y *Trichostrongylus colubriformis* (intestino delgado), tanto en sistemas de ganadería convencional (Artículo 3), como en infestaciones controladas (“indoor”) (Artículo 4). Se añaden así mismo, como parte de un estudio sistémico, dos artículos de revisión, uno sobre la interacción nutrición-parasitismo (Artículo 5) y otro, focalizado en las particularidades de los caprinos y su efecto en el empleo de Antihelmínticos alternativos (Artículo 6).

Los objetivos de la presente tesis se reflejan a continuación:

- A. Examinar los cambios funcionales y/o estructurales a nivel individual de los nemátodos gastrointestinales y medidas de fertilidad en el modelo *Caenorhabditis elegans* (Capítulo 1).
- B. Evaluar *in vivo*, el rol de distintos factores (naturaleza de los recursos ricos en Taninos, tiempo de exposición de los TCs en la dieta y especies GIs implicadas), que modulan los efectos de los taninos contra los NGIs (Capítulo 2).
- C. Revisar los efectos de la inclusión de los recursos ricos en Taninos por medio de estudios sistémicos (Anexo).

MATERIAL Y MÉTODOS/ MATERIAL AND METHODS

Los materiales y métodos empleados aparecen detallados en cada capítulo y/o experiencia. A nivel general, los experimentos seguirán la metodología de rutina asociada a la Helmintología Veterinaria (Ver Epígrafe 7 de la Introducción), que se especifica a continuación.

Como recursos taniníferos a testar, se utilizó la esparceta (*Onobrychis viciifolia*) y polvo de quebracho (*Schinopsis* spp) por su riqueza en TCs, subproductos del algarrobo (*Ceratonia siliqua*) y tzalam (*Lysiloma latisiliquum*), por la presencia de THs y TCs en su composición. Finalmente, la alfalfa (*Medicago sativa*) fue seleccionada como forraje libre de taninos, como control positivo. En la experiencia con *C. elegans*, se testaron polifenoles comerciales: flavonoles, flavanoles, chalcones, taninos hidrolizables, flavones e isoflavones.

A nivel metodológico, los posibles cambios estructurales *in vitro* e *in vivo* producidos en los vermes adultos del estudio 1, serán examinados a través de técnicas de microscopía electrónica de barrido. Los detalles concretos sobre la preparación de las muestras se recogen en el citado artículo, de la presente tesis.

Para la puesta en marcha del protocolo que permita la evaluación de los efectos en los vermes a nivel funcional, tras la exposición a taninos y polifenoles del estudio 2, se empleará el nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* N2, junto a *Escherichia coli* OP50 como fuente de alimento. Los protocolos para dicho ensayo han sido adaptados y modificados en función de los objetivos e hipótesis de investigación perseguidos, a partir de los protocolos estándar que pueden consultarse en Stiernagle, T. Wormbook.org.

Las infestaciones de carácter experimental, se realizan por administración oral de larvas infestantes L3 de *Haemonchus contortus* y/o *Trichostrongylus colubriformis*. Se medirá la intensidad y diversidad de las infestaciones parasitológicas a través de mediciones periódicas e individualizadas de parámetros parasitológicos (Muestreos coproparasitológicos: huevos por gramos de heces) y las consecuencias en el hospedador (medidas fisiopatológicas: peso, valor hematocrito (porcentaje de eritrocitos en sangre o PCV), Test FAMACHA®, etc.). Las medidas *in vivo* se completarán con una necropsia (número de vermes adultos por especie y órgano, análisis de la composición, ratio sexual y fertilidad de las hembras), tras sacrificar a los hospedadores al final del periodo experimental.

CHAPTER 1: OBSERVING DIRECT EFFECTS ON WORMS

STRUCTURAL CHANGES

ARTICLE 1: Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to Tannin- Rich Plants under *In vivo* and *In vitro* conditions

Authors

CINTLI MARTÍNEZ-ORTÍZ-DE-MONTELLANO^{a,b,c}, CELIA ARROYO-LÓPEZ^{a,b}, ISABELLE FOURQUAUX^d, JUAN FELIPE DE J. TORRES-ACOSTA^c, CARLOS A. SANDOVAL-CASTRO^c, HERVÉ HOSTE^{a,b*}

^a INRA, UMR 1225, F-31076 Toulouse Cedex, France

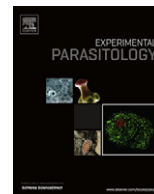
^b Université de Toulouse; ENVT; UMR 1225; F-31076 Toulouse, France

^c Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km. 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán; México

^d CMEAB; Faculté de Médecine de Rangueil, Université Paul Sabatier; 133 Route de Narbonne 31062 Toulouse Cedex 4, France

***Experimental Parasitology*, 133 (3), pp 281-286 (2013)**

***Corresponding author:** H. Hoste. *E-mail address:* h.hoste@envt.fr Tel: +33 561193875, Fax: +33 561193243



Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under *in vivo* and *in vitro* conditions

C. Martínez-Ortíz-de-Montellano^{a,b,c,d}, C. Arroyo-López^{a,b}, I. Fourquaux^e, J.F.J. Torres-Acosta^c, C.A. Sandoval-Castro^c, H. Hoste^{a,b,*}

^aINRA, UMR 1225, 23 Chemin des Capelles, F-31076 Toulouse Cedex, France

^bUniversité de Toulouse, ENVT, UMR 1225, 23 Chemin des Capelles, F-31076 Toulouse Cedex, France

^cFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, CCBA, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5 Carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán, Mexico

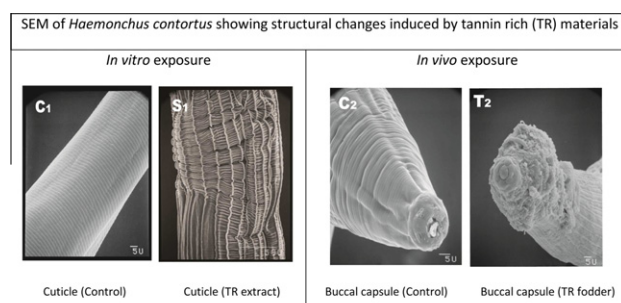
^dEscuela Superior de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Campeche, calle 53 s/n Escárcega, Campeche, Mexico

^eCMEAB; Faculté de Médecine de Rangueil, Université Paul Sabatier; 133 Route de Narbonne, F-31062 Toulouse, Cedex 4, France

HIGHLIGHTS

- By SEM, *H. contortus* exposed to tannin rich materials showed structural damage.
- Changes were found in the cuticle including aggregated material in the buccal area.
- Changes in the female reproductive system were found *in vitro* but not *in vivo*.
- The structural changes might affect worm motility, nutrition and reproduction.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 September 2012

Received in revised form 16 November 2012

Accepted 26 November 2012

Available online 12 December 2012

Keywords:

Tannins

Haemonchus contortus

Lysiloma latisiliquum

Onobrychis viciifolia

Scanning electron microscopy

Structural changes

ABSTRACT

The structural changes induced in adult *Haemonchus contortus* after *in vitro* and *in vivo* contact with a tannin-rich (TR) plant, either tzalam (*Lysiloma latisiliquum*) or sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), were assessed using scanning electron microscopy (SEM). All the worms used in the study were adult females. The *Haemonchus* adult worms were obtained from the abomasum of infected donor goats. Adult *H. contortus* were kept in contact with the extracts of TR plants for 24 h for the *in vitro* assays and were compared to worms maintained in PBS (control). For the *in vivo* studies, the adult *H. contortus* parasites were obtained from artificially infected goats. All the goats were fed a tannin-free diet until D27 post-infection when infection was patent. On D28 some goats were fed fodder of one of the TR plants for seven consecutive days. Thus, their *H. contortus* were in contact with TR fodder within the gastrointestinal tract. The control worms were obtained from goats fed only a tannin-free diet. In the *in vitro* assays and *in vivo* studies, the SEM observations revealed structural alterations in the worms after contact with TR plants when compared to the control worms (i.e.: longitudinal and transversal folds and thicker cuticular ridges, material aggregates around the buccal capsule and/or vulva or anus). The main changes concerned the cuticle and the buccal area. The structural changes found in the worms exposed to TR plants might affect their motility and nutrition with possible consequences on their reproduction, as suggested by previous *in vivo* trials.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: TR, tannin-rich; SEM, scanning electron microscopy; AH, anthelmintic; tzalam, *Lysiloma latisiliquum*; sainfoin, *Onobrychis viciifolia*; C, control worms; T, tzalam extract worms; S, sainfoin extract worms.

* Corresponding author at: INRA, UMR 1225, 23 Chemin des Capelles, F-31076 Toulouse Cedex, France. Fax: +33 561193243.

E-mail address: h.hoste@envt.fr (H. Hoste).

1. Introduction

Antiparasitic effects against gastrointestinal nematodes of ruminants have been associated with the consumption of fodder from tannin-rich (TR) legumes (Fabacea family) in a nutraceutical

approach. In temperate regions, the interest has focused on various legume forages like sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), sulla (*Hedysarum coronarium*), birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*), big trefoil (*Lotus pedunculatus*) or sericea lespedeza (*Lepedeza cuneata*) (Min and Hart, 2003; Hoste et al., 2006; Terrill et al., 2007). Moreover, previous studies have shown an anthelmintic (AH) activity associated with a range of tropical legume trees (Fabaceae) which are browsed by small ruminants in Africa (Kabasa et al., 2000; Kahiyia et al., 2003; Akkari et al., 2008a,b) and Latin America (Rojas et al., 2006). One of the tropical legume trees which has consistently shown an AH activity is *Lysiloma latisiliquum*. Its *in vitro* AH activity was first reported by Alonso-Díaz et al. (2008a,b). Meanwhile, the *in vivo* AH effect was reported by Brunet et al. (2008a) who found a reduced establishment of *Haemonchus contortus* in the abomasum of goats and Martínez-Ortiz-de-Montellano et al. (2010) who reported a reduction on fecal egg count, female fecundity and worm length. A prominent role of tannins is suspected to explain these AH properties. However, the modes of action of these polyphenolic compounds against nematodes remain obscure (Hoste et al., 2006; Mueller-Harvey, 2006). Some functional and ultrastructural changes have been recently described for the third-stage larvae with *O. viciifolia* (sainfoin) (Brunet and Hoste, 2006; Brunet et al., 2007, 2008a,b, 2011). In contrast, a similar approach has not been developed for the adult worms. The objective of this study was therefore to compare the structural changes induced in the adult *H. contortus* after contact with a tropical TR plant, tzalam (*L. latisiliquum*) and a temperate plant, sainfoin (*O. viciifolia*) under *in vitro* and *in vivo* conditions. These 2 Legume TR species were selected on the basis of moderate to high content of condensed tannins, because of availability in different geographical condition and also from the evidence of both the *in vitro* (Alonso-Díaz et al., 2008a,b) and *in vivo* AH effects on *H. contortus* (Brunet et al., 2008a; Martínez-Ortiz-de-Montellano et al., 2010).

2. Materials and methods

2.1. *In vitro* assays

2.1.1. Production of the TR extracts

Samples of the two experimental plants were collected to obtain plant extracts. Five hundred grams of fresh leaves of sainfoin (*O. viciifolia*) were collected in France and the same amount of leaves of tzalam (*L. latisiliquum*) was collected in Mexico. Each plant material was blended in a 70:30 mixture of acetone–water plus ascorbic acid (1 g/l) for 1 h (Alonso-Díaz et al., 2008b). The products were filtered and the filtrates were then concentrated under low pressure. The pigments were removed by washing 4 times with dichloromethane (3 × 50 ml). The sainfoin and tzalam experimental extracts were obtained after freeze drying (Alonso-Díaz et al., 2008a,b).

2.1.2. Collection of adult *Haemonchus contortus*

The female adult worms used in the *in vitro* trials were collected from two naturally infected goats fed a tannin-free diet (lucerne + commercial pelleted feed *ad libitum*). The goats were humanely slaughtered to collect the abomasums which were immediately transferred to the laboratory and opened in order to collect the female adult parasites using a fine brush.

2.1.3. *In vitro* exposure to TR extracts

The worms were immediately placed into a 24-multiwell plate (one female worm per well) containing PBS (2 ml at 37 °C). From this moment, all the procedures with the parasites in the multiwell plates were performed at 37 °C. The worms were first kept in the

wells for 1 h to clean them from the abomasal contents. Thereafter, the PBS was discarded from the wells and was replaced by either PBS (2 ml) (control worms) (C) or tzalam extract in PBS (1200 µg/ml PBS) (T) or a similar quantity of sainfoin extract in PBS (S). Four worms were used per treatment and were incubated for 24 h. After the incubation period, the worms were collected and were placed in 1.5 ml Eppendorf tubes with the fixative for scanning electron microscopy (SEM) as described below.

2.2. *In vivo* studies

Two *in vivo* studies were performed. One study aimed at evaluating the structural changes produced by feeding the TR tropical fodder tzalam (*L. latisiliquum*) and was performed at FMVZ-UADY, Merida, Mexico. A second study examined the possible structural changes induced in *H. contortus* of animals fed with sainfoin (*O. viciifolia*). This study was performed at the Veterinary School in Toulouse, France (UMR 1225 INRA-DGER IHAP).

2.2.1. Tzalam study

Fresh leaves of tzalam were harvested from the tropical forest surrounding Merida, Mexico. Four Criollo kids were artificially infected with 3000 L₃ of a Mexican strain of *H. contortus* (CENID-PA-VET-INIFAP strain) and were housed in metabolic cages with slatted floors, equipped with individual feed and water troughs to avoid the risk of further nematode infections. All the animals received the same balanced tannin-free diet (30 g/kg LW). From D28 post infection, three kids were supplemented with 800 g of tzalam fresh leaves. The amount offered ensured that all the leaves were consumed by the experimental animals. A single animal continued to receive the tannin-free diet. The tzalam leaves were offered during seven consecutive days. Goats were humanely slaughtered complying with local regulations on animal welfare. Their abomasa were removed to collect the adult worms and immediately fixed as described below.

2.2.2. Sainfoin experiment

The sainfoin hay was obtained from Clermont-Ferrand, France. Two goats were experimentally infected with 5000 *H. contortus* infective larvae (INRA strain). The goats were fed until D28 after infection with grass hay of good quality plus a commercial concentrated feed. One goat was maintained with the tannin-free diet and used as a control animal (C). On D28, the second goat received *ad libitum* sainfoin hay instead of the grass hay. The goats were fed these diets for seven consecutive days. Both goats were kept in individual pens equipped with trough for feeding and automatic water suppliers. Subsequently, goats were humanely slaughtered with an overdose of sodic pentobarbital (Doletal[®], France). Their abomasa were removed and rapidly processed in order to collect the adult worms which were immediately fixed as described below.

2.3. Procedure of scanning electron microscopy (SEM)

The worms obtained from both the *in vitro* assays and the *in vivo* studies were fixed in a 2% glutaraldehyde solution in a 0.1 M sodium cacodylate buffer for 4 h at 4 °C. After two washes in the same buffer (0.2 M), the worms were dehydrated in a graded ethanol series, dried by critical point drying with EMSCOPE CPD 750 and coated with gold–palladium for 5 min at 100 Å min^{−1}. Parasites were then observed with a S450 scanning electron microscope (Hitachi) at an accelerating voltage of 15 kV.

3. Results

3.1. *In vitro* assays

Fig. 1 shows the changes found in *H. contortus* adult worms after the *in vitro* exposure to TR extracts. The main changes observed between the control (C), the sainfoin (S) and the tzialam (T) treated *H. contortus* concerned the surface of the body (cuticle), the cephalic region, the vulva and the anus of the female worms. When compared to the control worm body parts, which presented a smooth cuticle surface (C₁, C₂ and C₃), the parasites treated with both TR plant extracts lost their normal aspect by showing longitudinal and transversal folds and thicker ridges in the cuticle (S₁ and T₁). These lesions were observed either on the totality of the body or

by patches along the entire nematode body including the cephalic parts (S₂, T₂) and the rest of the body (S₁ and T₁), as well as the distal portion of the worms (not shown). Moreover, the most striking changes observed were the aggregates located around the buccal capsule (S₂ and T₂), the female vulva (T₃) or the anus (S₃).

3.2. *In vivo* studies

Fig. 2 shows the changes found in *H. contortus* adult worms after the *in vivo* exposure to TR fodder for seven days. The main changes found in the *H. contortus* females collected from the sainfoin or tzialam fed kids, when compared to the worms from the control kids, concerned the cuticle and to a lesser extent the buccal capsule. When TR plants were fed to animals, both TR plants had an effect

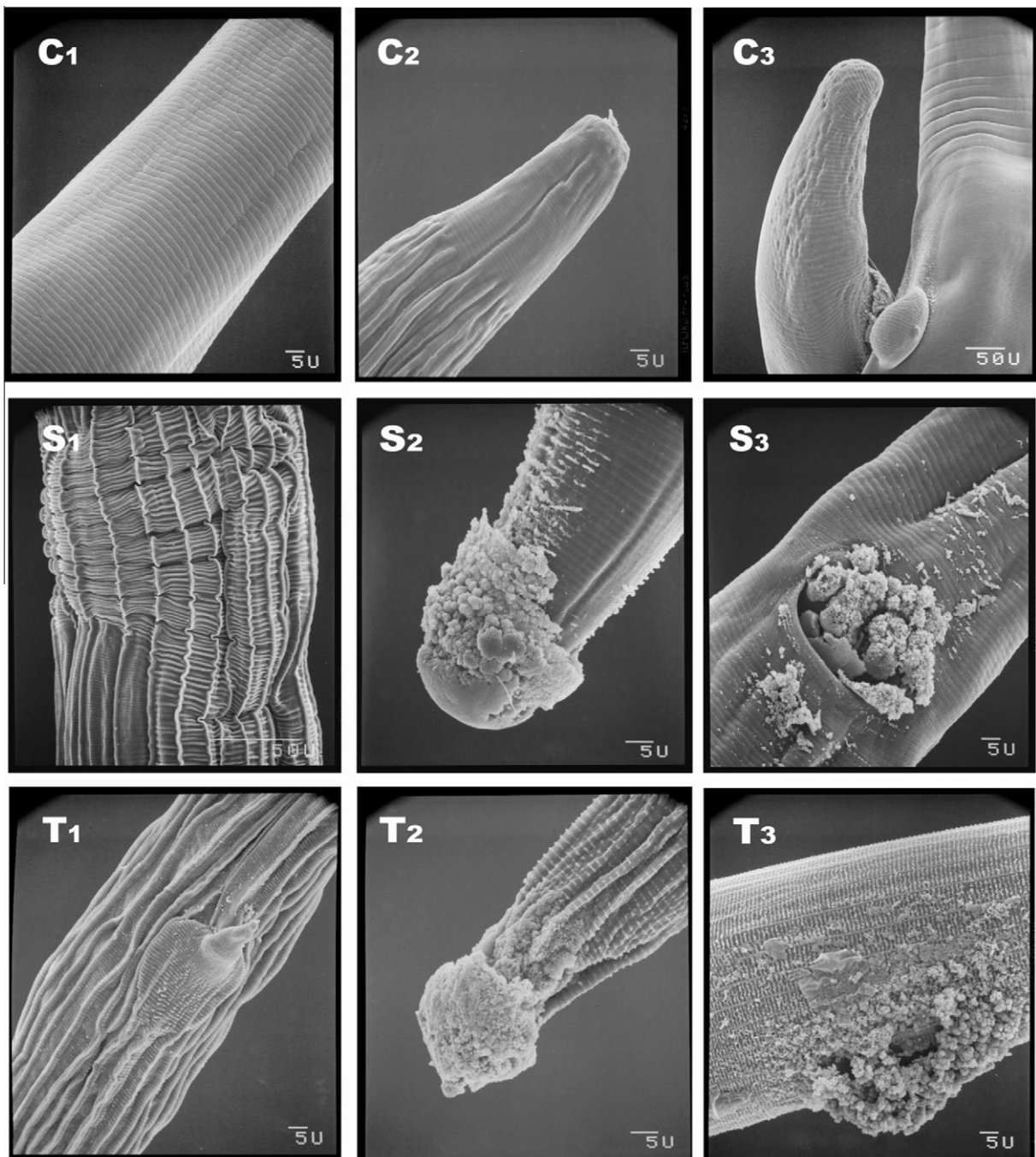


Fig. 1. Comparison of the external structure of adult female *Haemonchus contortus* in contact with PBS control (C) or a tannin rich plant extract, either *Onobrychis viciifolia* (S) or *Lysiloma latisiliquum* (T), under *in vitro* conditions. Column 1: general view of cuticle; Column 2: cephalic region; Column 3: distal region of the female worm.

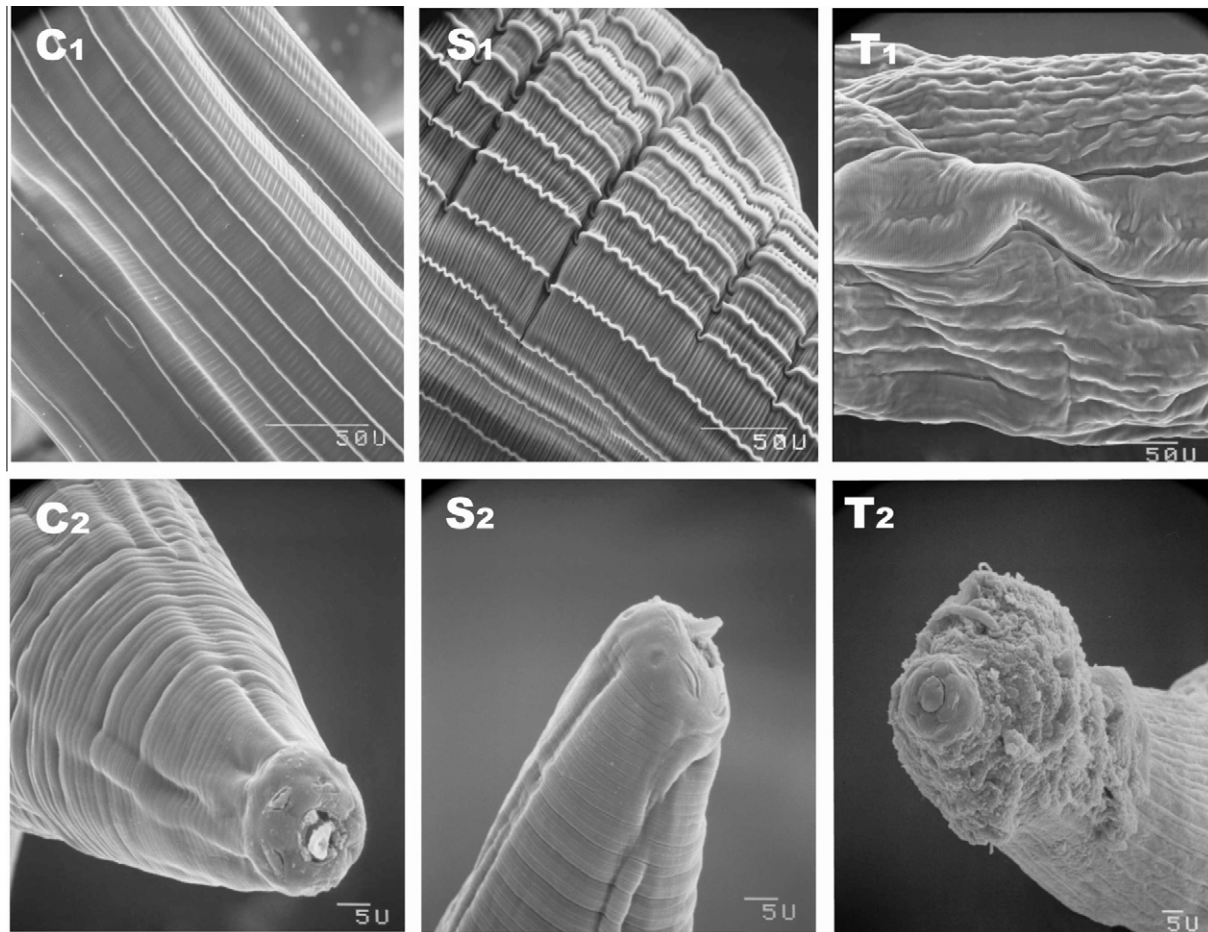


Fig. 2. Comparison of the external structure of adult female *Haemonchus contortus* in contact with a tannin-free control diet (C) or a tannin rich diet containing either *Onobrychis viciifolia* (S) or *Lysiloma latifolium* (T) under *in vivo* conditions. Line 1: general view of cuticle; Line 2: cephalic region.

on the cuticular structure since transversal and longitudinal thickening/wrinkling of the cuticular ridges were observed with both the sainfoin (S₁) and the tanzania regime (T₁). For tanzania, some aggregates were observed in the cephalic region (Fig. 1: T₂). These aggregates were similar to those found under *in vitro* conditions. However, no obvious differences were detected between the control (C₂) and the sainfoin (S₂) nematodes. In the vulvar region, no obvious differences were observed between the worms collected from animals receiving either the control, sainfoin or tanzania diets (data not shown).

4. Discussion

The possible consequences of the consumption of fodder from a TR source on adult worm populations have been widely investigated for the last 15 years (see reviews by Hoste et al., 2006). In particular, the effect obtained by feeding nutraceuticals to small ruminants with either a tropical (tanzania), a subtropical (sericea lespedeza) or a temperate tannin containing legume (sainfoin) on established adult populations of *H. contortus* have been examined previously in sheep (Lange et al., 2006; Heckendorn et al., 2006, 2007; Martínez-Ortiz-de-Montellano et al., 2010; Manolaraki et al., 2010) or goats (Paolini et al., 2003a,b, 2005a,b; Shaik et al., 2004; Terrill et al., 2007, 2009). The main overall effect was a significant reduction in egg excretion which reached ~ 80% from the control values in some studies (Lange et al., 2006; Manolaraki et al., 2010). This change has been related either to a reduction

in the worm number (Heckendorn et al., 2006, 2007; Terrill et al., 2007, 2009) and/or to a reduced fertility per female worm when this parameter was measured (Lange et al., 2006; Heckendorn et al., 2007; Manolaraki et al., 2010; Martínez-Ortiz-de-Montellano et al., 2010; Paolini et al., 2003a,b, 2005b).

While a number of reports have described the action of tannins and polyphenols against third-stage infective larvae (Brunet et al., 2006, 2007, 2008a,b, 2011), less information is available on the possible mode of action of tannins and polyphenols against adult worms. Only a few *in vitro* studies have examined the possible effects of TR plant extracts on the worm's functions such as motility and/or mortality, including *H. contortus* (for example Paolini et al., 2004). Under *in vitro* conditions, the contact with sainfoin extracts has been associated with a reduced viability of adult *H. contortus* (Paolini et al., 2004). Some evidence of cuticular lesions have been observed by SEM in nematodes exposed to papaya latex and ficin (plant proteinases) (Behnke et al., 2008). However, to our knowledge the current study is the first one to use SEM to explore structural changes induced to adult worms by TR materials, although some cuticular changes have been presented previously for *T. colubriformis* exposed to chestnut extract which is also rich in tannins (Hoste et al., 2006).

The SEM changes observed in the *in vitro* trials proved the occurrence of strong interactions between the TR extracts and several worm structures, in particular the cuticle, which has an important role in many nematode functions. However, these *in vitro* observations have been acquired with a relatively high

concentration of tannin extracts (1200 µg/ml), and occurred within a short period of time, i.e. after a 24-h-contact with extracts. For these reasons, the second set of studies were performed under *in vivo* conditions by feeding goats with fodder of both TR plants in order to verify if the changes described under the *in vitro* conditions also occurred when the infected animals are fed the TR materials for a period of seven consecutive days. In these *in vivo* studies the parasites might have been exposed to lower concentrations of tannins within the lumen of the host abomasums.

In both *in vitro* and *in vivo* conditions, the main effects were changes in the cuticle and, to a lesser extent, the buccal capsules. On the other hand, the structural modifications of the external parts of the female reproductive systems were found *in vitro* but were not present in the *in vivo* studies.

It is worth to note that some consistencies existed between the changes produced to *H. contortus* whatever the TR legumes applied, both under *in vitro* and *in vivo* conditions. These similarities suggest that similar plant secondary metabolites (PSMs) could be present in both legumes and might explain the changes. Because both sainfoin (Mueller-Harvey, 2006) and tzalam (Alonso-Díaz et al., 2008a) contain tannins and polyphenols, these biochemical compounds appeared as the main candidates to explain the common cuticular lesions. Interestingly, these changes also correspond to those described after the contact of *T. colubriformis* with chestnut extracts (Hoste et al., 2006). On the other hand, when comparing the cuticular modifications induced by sainfoin and tzalam, it appears that, in both *in vitro* and *in vivo* conditions, the temperate legume created both longitudinal and transversal ridges when tzalam induced mainly a longitudinal thickening of the worm synlophe ridges. Moreover, the changes to the worm cuticle observed after contact with chestnut extracts appeared also different (Hoste et al., 2006). It can be hypothesized that the high diversity in the nature of tannins, differing between plants, can influence the interactions with the worm macromolecules, especially the proteins and glycoproteins.

The cuticle gives the shape of the worms. It is also involved in its motility and in the exchanges with the parasite environment, including the metabolic exchanges with the local environment in the digestive tract of the host (Fetterer and Rhoads, 1993; Page, 2001; Page and Winter, 2003). Associated functional disturbances and the structural cuticular changes described in the current study might lead to possible impairments in the free movements of the nematodes (seeking for feeding sites and mating opportunities). On the other hand, it can be speculated that the presence of aggregates around the anterior part of the digestive tract (i.e. buccal capsule), which were found in both *in vitro* and *in vivo* conditions, may disturb the nematode's nutrition, which might eventually lead to worm undernourishment, reduced fertility and/or mortality which has been previously reported in *in vivo* trials. The potential presence of aggregates in the cephalic part of *H. contortus* might disturb the mechanical and/or enzymatic processes which are normally involved in the consumption of blood meals by the worms (Fetterer and Rhoads, 1997). Last, the structural changes in the external reproductive organs of female worms, which were clearly observed only under *in vitro* conditions, could affect the nematode reproductive function (e.g. by mechanical obstruction to egg production or expulsion). On the other hand, the direct effect on the reproductive tract has not been confirmed in the *in vivo* experiments. However, it can also be hypothesized that various reproductive processes, particularly egg production, might also be affected by the nutritional disturbances, as described above. These observations are consistent with the significant decreases in egg excretion repeatedly reported when animals consumed a TR source (Hoste et al., 2006) and the reduced female fecundity reported in *in vivo* studies (Martínez-Ortíz-de-Montellano et al., 2010).

5. Conclusion

The SEM observations revealed structural alterations in the worms after *in vitro* and *in vivo* contact with TR plants when compared to the control worms. The main changes concerned the cuticle and the buccal area. The structural modifications of the external parts of the female reproductive systems were found only under *in vitro* conditions. The structural changes found in the worms exposed to TR plants might affect their motility and nutrition with possible consequences on their reproduction. Transmission electron microscopy may help to understand the external changes observed in *H. contortus*.

Acknowledgments

C. Martínez-Ortíz-de-Montellano wishes to acknowledge a scholarship from CONACYT, México for her PhD studies. The present study was supported by the Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT) and the Marie Curie Program «Healthy Hay» project, as well as an ECOS-Nord/CONACYT (project M03-A03).

We thank Pedro Mendoza-de-Gives (CENID-PAVET-INIFAP, Mexico) for providing *Haemonchus contortus* infective larvae. The authors would like to thank Rodrigo Carrillo-Peraza, for his technical assistance during the experiment. A special thank to Juan Pablo Hurtado-Montero for his meticulous work with the microphotographs.

References

- Akkari, H., Ben Salem, H., Gharbi, M., Abidi, S., Darghouth, M.A., 2008a. Feeding *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage to Barbarine lambs with or without PEG: effect on the excretion of gastrointestinal nematode eggs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147, 182–192.
- Akkari, H., Darghouth, M.A., Ben Salem, H., 2008b. Preliminary investigations of the anti-nematode activity of *Acacia cyanophylla* Lindl.: excretion of gastrointestinal nematode eggs in lambs browsing *A. cyanophylla* with and without PEG or grazing native grass. *Small Rumin. Res.* 74, 78–83.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Capetillo-Leal, C.M., Brunet, S., Hoste, H., 2008a. Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet. Parasitol.* 153, 187–192.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Hoste, H., 2008b. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* exposed to four tropical tanniniferous plants. *Vet. Parasitol.* 153, 313–319.
- Behnke, J.M., Buttle, D.J., Stepek, G., Lowe, A., Duce, I.R., 2008. Developing novel anthelmintics from plant cysteine proteinases. *Parasit. Vectors* 1, 29.
- Brunet, S., Hoste, H., 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7481–7487.
- Brunet, S., Auffere, J., El Babili, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract. *Parasitology* 135, 1–10.
- Brunet, S., Martínez-Ortíz-de-Montellano, C., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Capetillo-Leal, C., Hoste, H., 2008a. Effect of the consumption of *Lysiloma latissiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Vet. Parasitol.* 157, 81–88.
- Brunet, S., Jackson, F., Hoste, H., 2008b. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *Int. J. Parasitol.* 38, 783–790.
- Brunet, S., Fourquaux, I., Hoste, H., 2011. Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with a sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitol. Int.* 60, 419–424.
- Fetterer, R.H., Rhoads, M.L., 1993. Biochemistry of the nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. *Vet. Parasitol.* 46, 103–111.
- Fetterer, R.H., Rhoads, M.L., 1997. The *in vitro* uptake and incorporation of hemoglobin by adult *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 69, 77–87.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W., Hertzberg, H., 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Vet. Parasitol.* 142, 293–300.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Senn, M., Hertzberg, H., 2007. Individual administration of three tanniniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Vet. Parasitol.* 146, 123–134.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 22, 253–261.

- Kabasa, J.D., Opuda-Asibo, J., Ter Meulen, U., 2000. The effect of oral administration of polyethylene glycol on faecal helminth egg counts in pregnant goats grazed on browse containing condensed tannins. *Trop. Anim. Health Prod.* 32, 73–86.
- Kahiya, C., Mukaratirwa, S., Thamsborg, S.M., 2003. Effects of *Acacia nilotica* and *Acacia karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. *Vet. Parasitol.* 115, 265–274.
- Lange, K.C., Olcott, D.D., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Terrill, T.H., Burke, J.M., Kearney, M.T., 2006. Effect of sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lamb. *Vet. Parasitol.* 141, 273–278.
- Manolaraki, F., Sotiraki, S., Stefanakis, A., Skampardonis, V., Volanis, M., Hoste, H., 2010. Anthelmintic activity of some mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology* 137, 684–696.
- Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Vargas-Magaña, A.J., Canul-Ku, L., Miranda-Soberanis, R., Capetillo-Leal, C., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2010. Effect of a tropical tannin-rich plant, *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Parasitol.* 172, 283–290.
- Min, B.R., Hart, S.P., 2003. Tannins for suppression of internal parasites. *J. Anim. Sci.* 8, 102–109.
- Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 86, 2010–2037.
- Page, A.P., 2001. The nematode cuticle: synthesis, modification and mutants. In: Kennedy, M.W., Harnett, W. (Eds.), *Parasitic Nematodes: Molecular Biology, Biochemistry and Immunology*. CABI Publishing, London, pp. 167–193.
- Page, A.P., Winter, A.D., 2003. Enzymes involved in the biogenesis of the nematode cuticle. *Adv. Parasitol.* 53, 85–148.
- Paolini, V., Bergaud, J.P., Grisez, C., Prevot, F., Dorchies, Ph., Hoste, H., 2003a. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 113, 253–261.
- Paolini, V., Dorchies, P., Hoste, H., 2003b. Effects of sainfoin hay on gastrointestinal nematode infections in goats. *Vet. Rec.* 152, 600–601.
- Paolini, V., Fouraste, I., Hoste, H., 2004. *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin extracts on third-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology* 129, 67–77.
- Paolini, V., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2005a. Lack of effects of quebracho and sainfoin hay on incoming third-stage larvae of *Haemonchus contortus* in goats. *Vet. J.* 170, 260–263.
- Paolini, V., De La Farge, F., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2005b. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 127, 277–283.
- Rojas, D.K., Lopez, J., Tejada, I., Vazquez, V., Shimada, A., Sanchez, D., Ibarra, F., 2006. Impact of condensed tannins from tropical forages on *Haemonchus contortus* burdens in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) and Pelibuey lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 128, 218–228.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, D., Kouakou, B., Kamman, G., Kallu, R.K., Mosjidis, J., 2004. Effects of feeding sericea lespedeza hay to goats infected with *Haemonchus contortus*. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34, 234–237.
- Terrill, T.H., Mosjidis, J., Moore, D.A., Shaik, S.A., Miller, J.E., Burke, J.M., Muir, J.P., Wolfe, R., 2007. Effect of pelleting on efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats. *Vet. Parasitol.* 146, 117–122.
- Terrill, T.H., Dykes, G.S., Shaik, S.A., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2009. Efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats: dose titration study. *Vet. Parasitol.* 163, 52–56.

ARTICULO 2. *Caenorhabditis elegans*: a model to study the anthelmintic effects of polyphenols on the fertility of parasitic nematodes?

Authors

ARROYO-LOPEZ, C. ^{1,4}, BOURY, M. ^{2,3}, NOUGAYREDE, J.P.^{2,3}, MANOLARAKI, F.^{1,4}, OJEDA ROBERTOS, N.^{1,4}, and HOSTE, H. ^{1,4}

¹ INRA, UMR 1225 Interactions hôte-agents pathogènes

² INRA, USC 1360, Toulouse, France, INSERM, UMR 1043, Toulouse France

³ Université de Toulouse UPS, Centre de Physiopathologie, Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse, France.

⁴ Université de Toulouse, ENVT, UMR 1225 23, Chemin des Capelles, 31076 Toulouse

In preparation

Abstract

Preliminary results of a small-scale assay was performed in order to establish a model to screen the Anthelmintic effects of polyphenols on free- living nematode *Caenorhabditis elegans*. *C. elegans* cultures were grown in solid Nematode Grown Medium. The effects of commercial flavonols, flavanols, chalcones, and hydrolysable tannins, flavones e Isoflavones were screened on egg-lying and egg-hatching behavior. A wide variability of outcomes was obtained depending on each assay and monomer concentration. No lethal or bagging effects were seen in any of the assays. A wide variability of results was observed in case of egg- hatching, with effects on the increase or decrease of the ratio depending on the monomers. None of the results were enough statistically strong, so a higher number of replications is suggested. Even though, the solid NGM seems to be a feasible medium to evaluate the anthelmintic effects on functional nematodes' parameters associated to different concentration of monomers and extracts. Results might be comparable to those expected in adult gastrointestinal nematodes *in vivo*, based in the similarities of their cuticle and the dauer larva and L3 gastrointestinal nematode larvae.

Keywords: Anthelmintic, *C. elegans*, polyphenols, flavonoids, condensed tannins, hydrolysable tannins.

1. Introduction:

Limits on the anthelmintic screening assays arises in Gastrointestinal Nematodes (GINs) due to the complexity of their biological cycles (Holden-Dye and Walker, 2007). Some of their stages are limited to luminal compartments as gastrointestinal tract. Parasitologists find then, difficulties on the maintenance of adult stages alive outside the host in *in vitro* experiences, also because environments are substantially different (Sangster and Gill, 1999). Contrarily, the free-living soil inhabiting *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900), is a short life and normally hermaphrodite nematode (Wood, 1988). This ease culture nematode, is considered a proper model in genetics, biochemistry and physiology experiences (Hiepe et al., 2006). It has the advantages that can grown either in solid medium as agar Petri plates or liquid, but also It can be frozen and stored (-70°C) for some months (Stiernagle, 2006). Even though, the use of *C. elegans* as a model in new anthelmintic (AH) approaches remains controversial, due to the differences on life cycles between parasites and the free –living worms (Geary and Thompson, 2001). Despite of this fact, we can consider that Nematoda phyla shares similar characters independently to their habitats (Holden-Dye and Walker, 2007), in the genomical organization and the homology of some specific genes (Mitreva et al., 2005). In addition, some authors remark a closed association between the Order Rhabditida (*C. elegans*) with the Order Strongylida (*H. contortus* and *T. colubriformis*) responsible of the major trichostrongyliasis on ruminants (Geary and Thompson, 2001). Likewise, *Caenorhabditis elegans* dauer larvae is believed to share analogies with L3s infective larvae (Hotez et al., 1993). So, apart from any molecular differences, *C. elegans* could not be so far from the parasitic species than the differences found between each species of the phylum (Holde and Wlaker 2007) *per se*. Until now, *in vitro* and *in vivo* screening assays with plants rich in secondary metabolites, particularly in Condensed tannins, have revealed AHs effectiveness against Gastrointestinal Nematodes (GINs), but the mechanisms subliying this phenomena has not been elucidated. Effects on egg hatching, larval motility, (Hoste et al., 2006), (L3s) exsheathment (Brunet and Hoste, 2006) and L3 larvae establishment (Brunet et al., 2008) have been described, meanwhile, just a few studies are focused on the effects on adult stages (Manolaraki et al., 2010), see review (Hoste et al., 2012). The supervision of AH effects on adult worm population, implies the killing and dissection of hosts. The use of *C. elegans* as model for AH screening, provides the advantages of a low cost *in vitro* laboratory method, to better understand the mechanism of action of different compounds against adult parasitic stages (Katiki et al., 2011). Besides the nematocidal effect, the mode of action of anthelmintic drugs can be evaluated, making possible to measure the effects on reproduction, on nematode behavior and/ or locomotion (Sangster and Gill, 1999; Strange, 2006). Until now, many other parasitologists have also include this model in the screening of plant extracts (McGaw et al., 2007; Waterman et al. 2010), purified fractions and plant compounds (Smith et al., 2009) effects. The likeness of *C. elegans* dauer larvae and the (L3) larvae stage from GINs, as well as the similarities on the structure of their cuticle (Bürglin et al., 1998) as the glycoproteins composition of the cuticle with *H. contortus* with *C. elegans* (Fetterer, 1989), support the hypothesis that the anthelmintic effects observed in *C. elegans* cultures might be also expected in related nematodes (Thompson et al., 1996) such as GINs. Under these premises, the aim of this work was: 1) to establish the bases of a AH screening model system on a solid NGM medium for adult *C. elegans* nematodes, 2) to screen changes

in the fertility (egg lying and egg hatching) behavior and larval development, after the exposure to different monomers concentrations, 3) to compare the AH effectiveness of some flavonoids, precursors of flavonoids and Hydrolysable Tannins (HTs).

2. Material and Methods

2.1. Localization

Bacterial cultures, monomer solutions and different media preparation that required aseptic conditions were carried out in the Unité Mixte de Microbiologie Moléculaire, Institut National de la Recherche Agronomique-Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, (France). The culture of *C. elegans* and the rest of anthelmintic tests and assays were performed in the UMR 1225 INRA/DGER Interaction Hôtes-agents Pathogènes, Institut National de la Recherche Agronomique-Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, (France).

2.2. Animals

A synchronized worm population of *Caenorhabditis elegans*, Bristol strain, N2 line, from a culture grown at 20°C in the UMR 1225 INRA/DGER Interaction Hôtes-agents Pathogènes, ENVT Toulouse (France). Adults were identified under microscope bearing 6 to 9 eggs in the uterus (Altun et al. 2012), young adult had no eggs in the uterus but a white dot located in the vulva (www.wormatlas.org).

2.3. Bacterial culture

E. coli OP50-bacteria were freshly cultured in LB medium (Unité Mixte de Microbiologie Moléculaire, Institut National de la Recherche Agronomique-Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, (France)), overnight at 37°C following the routinely protocols of bacterial growing (Stiernagle, 2006).

2.4. Monomers

Ten different purified monomers provided by Sigma-Aldrich (www.Sigma-Aldrich.com) were tested. Flavonols: Quercetin and Rutin, Flavanols: (+)- Catechin hydrate 98% and (-)- Epigallocatechin gallate 95% from green tea, Chalcones: Phloretin and Phloridzin dihydrate from apple, Isoflavone: Genistein ≥ 98%, Flavone and the Hydrolysable Tannins: Gallic acid and Tannic acid. Solvents were Phosphate Buffer Solution (PBS) or Methanol depending on monomers solubility.

2.5. Experimental design

Preparation of monomers' solution. Different solvents were used depending on monomers solubility. Quercetin, Rutin, (+)- Catechin hydrate and (-)- Epigallocatechin gallate monomers in PBS. Phloretin, Phloridzin dihydrate, Genistein, Flavone, Gallic acid and Tannic acid in methanol (max 0.002% final concentration) to get a 200mM stock solution. Then, 200mM solutions were directly added and progressively diluted into the food source, the LB bacterial medium to get a final concentration of 20, 10 and 5 µM of monomer in *E. coli* OP50 (0.6 optical density (O.D.)). Control negative solution was *E. coli* OP50 in LB medium (0.6 O.D.) free of monomers. The same amount of Methanol (max. 0.002%) was added to control plates. Bacteria were cultured for 72 hours to in order to discard any bactericide effect.

Preparation of Nematode Grown Medium (NGM). Fresh NGM made with 3 g NaCl +17 g Pastagar + 2.5 g Pastona (BIORAD) + 975 ml H₂O + 1 ml 1 M CaCl + 1 ml (5 mg/ml) cholesterol in ethanol + 1 ml 1M MgSO₄ + 25 ml 1M KPO₄. Petri plates 60mm of diameter, were seeded with 500µl of each solution.

The entire surface was homogenously covered with the control or test solution, in order to avoid empty places in the agar. All the Petri plates used within the assay were made per duplicate, at the same moment, overnight at room temperature to let them dry and kept at 4°C until used.

Bleaching and synchronization of *C. elegans* population. Three days before the assay started (D (-3)), a stocked *C. elegans* culture was cleaned using a bleaching procedure (M9+ 0.4ml Household bleach+ 0.46ml 5N KOH) (Stiernagle, 2006). The eggs were collected and kept in M9 buffer solution and overnight at room temperature. The following day after bleaching (D(-2)), 100 µL of M9+ Eggs solution was added to each Petri plate (Control, 20, 10 and 5 µM of monomer). Nematodes were grown from eggs to adulthood for ± 2.5 days at 20°C. Two replications per concentration were tested each 24 hours: 2 Control+ 2X₂₀ +2X₁₀ +2X₅ +2Y₂₀ +2Y₁₀ +2Y₅. All the worms used in each assay came from the same original population.

Assay start and evaluation. After arising to adulthood in the experimental conditions 12 to 15 adult worms were transferred to fresh NGM experimental plates. For a better visualization a stereomicroscope LEIKA EZ4D equipped with a transmitted light source was used. Six assays were independently performed, testing two different monomers each time: 1) Quercetin (Q) vs. Rutin (R), 2) (+)- Catechin hydrate (C) vs. (-)- Epigallocatechin gallate (EGCG), 3) Phloretin (PTN) vs. Phloridzin dihydrate (PDN), 4) Genistein (GE) vs. Flavone (FLA), 5) Gallic acid (GA) vs. Tannic (TA) in Methanol max 0.002%, 6) Flavone (FLA)- Control in methanol max 0.002% (Table 1). Each assay was validated with their own control negative plates methanol or methanol free. Two replications were performed per concentration (Control, 20, 10 and 5 µM) each time at 24, 48 and 72 hours. Adults were transferred to fresh plates each 24h, to avoid overlapping generation till 72h. After each transfer, some drops of iodine were added to dye the eggs and to arrest development of any larvae. Eggs and larvae in agar surface were counted using squared references drawn at the bottom of the Petri-plates (1cm x 1cm wide).

Measurements

Egg-lying rate. Effects on egg- lying rate was periodically scored. Mean Fertility per time was an average of total replications, after adding the total amount of eggs and first stage larvae (L1) per plate at 24, 48 and 72 h. Total Fertility per concentration was worked out considering both replications.

Egg-hatching, percentage of eggs developed to larvae. The number of eggs hatched were represented by active larvae counted every 24 hours. Percentage of development (egg hatched) per time (at 24, 48 and 72h) was calculated following this formula: Number of larvae/Fertility ($\Sigma \text{egg} + \text{larvae}$) x100, under microscope. Average was performed considering the two replications per time and concentration. Mean percentage of development was an average of the whole percentages of development per monomer concentration.

Egg hatching percentages of reduction. Percentages of egg hatching reduction or increases well as egg hatched rate, were established per concentration contrasting in each assay with their own control plates. Values were expressed as a percentage of increase or decrease respect to control values.

2.6. Statistical analysis

An independently Split-plot ANOVA repeated a measures analysis was performed for “Fertility per time” and “Percentage of development per time”, Data were not transformed (Hart, 2006). The non parametric

tests Kolmogorov-Smirnov (Normality), Kendall and Friedman tests were also performed followed by the Non parametric Spearman's Rho and Partial Correlation tests' (SPSS 12.0).

3. Results

3.1. Egg-lying rate.

The Split-plot Repeated Measures, arises significant differences for the effect of time Within-subjects effects on the fertility of worms (egg- lying rate) for all the assays ($p=0.000$). Contrary for the Non parametric test Friedman and Kendall, the only significance was found for GE- FLA and FLA- Control assays ($p=0.000$) at 24, 48 and 78 hours. No differences were found for the effect of time* monomer concentration interaction. Post Hoc test Multiple Comparison (Games Howell), was statistical significant ($p<0.05$) for C20 compared to Control and C10.

3.2. Egg hatching, percentages of eggs to larvae development.

The Split-plot Repeated Measures showed significant differences for the effect of time within-subjects in terms of development (egg hatching) ($p<0.05$) but for EGCG-C, confirmed a posteriori by the Non parametric test Friedman and Kendall. Time*monomer concentration interaction was significant ($p<0.05$) for the Hydrolysable tannins assay GA and TA as well as in the second assay for FLA vs. Control, being closed to significant for the flavonols Q and R. Test of Between-subjects effects was significant ($p<0.05$) for Q-R Assay and GE- FLA assays respectively. A negative Spearman's Rho correlation was found for EGCG-C ($p<0.05$) in a Moderate level, a Good correlation for PTN-PDN ($p<0.05$) and a Very good correlation for GA-TA ($p<0.01$), respectively. Contrary, a positive Spearman's Rho correlations were found for GE-FA Assay ($p<0.05$) in a moderate level (Table 2). Partial Correlation showed a Negative Good Correlation for PTN and PDN and a Moderate for GA-TA ($P<0.05$) and closed to significant was EGCG- C (Table 3).

3.3. Egg hatching percentages of reduction

The highest percentages of reduction respect to control plates per assay were slightly higher than 30% ($>30\%$), followed by percentages between 29.99 and 20%. FLA5 showed a reduction $>30\%$ in egg-lying ratio, followed by C20, EGCG10, PTN20, GE20 and GE5 (29.99- 20%). In case of egg-hatching none of the percentages arrive up to 30%, being the highest values within the range 29.99-20%: Q5, R20, R10 and GE5. An increase on egg hatched percentage respect to Control was observed for EGCG10 (Table 4).

4. Discussion

The selection of a solid NGM relied on the difficulties founded to detect and count the number of eggs lied in the multiwell plates while using LB medium. The same situation was found for first generation evaluation when measuring the number of L1 larvae. Even when we used FUdR to avoid worms to stick in the tip; the final number was far away from the real ones (Data not shown). In an effort to find a test to measure effects on worms fertility, solid NGM facilitated worm transferences, egg counts and first generation measures. Some of the monomers screened in the present trial required a dilution in methanol, because, they were not soluble in PBS. The use of methanol as solvent for some of the monomers (less than 0.002% final concentration) was considerate to have a low toxicity against C.

C. elegans (Katiki et al., 2011). Even though prior to *C. elegans* tests, an antibiotic tests against *E. coli* OP50 in LB+ experimental monomer concentration, was performed for 72h to check viability of bacteria and to reject any antibacterial activity (data not shown). Experimental LB solution did not kill our *E. coli* OP50 bacterial food resource (data not shown), so the selection of NGM solid medium was the best option for our aims and the possibility of screening the AH effectiveness of polyphenols using *C. elegans* cultures in solid medium. Nor lethal effects on worms neither bagging (hatching of the progeny inside the parent worms) (Bull et al., 2007) were observed trough our trials. This was also another aspect to consider in the acceptance of solid NGM. We pretended to analyze the effects of a life cycle exposure on the second worm generation; *C. elegans* were grown in the experimental conditions from egg to adulthood, then this first generation of wild type worms, were directly seeded into fresh experimental plates. When analyzing the possible alterations on egg-lying ratio, the effect of time appeared to be most significant factor within subjects through the assays. Based on that, we can justify an effect of worm phenology and senescence (Hart, 2006) and obviously not due the treatment *per se*. Normally the maximum pick was observed at 48 hours after seeded, but in case of the isoflavone monomers assay (Genistein and Flavone) the maximum pick of egg lying was noticed at 72h. Even in this case we can neither assume an inherent effect due to a particular anthelmintic activity of the monomers tested, because the screened worms were still young adults (not carrying eggs inside) (Sulston and Hodgkin, 1988) at the beginning of the assay. So in this particular case, the variations on maximum pick of egg-lying (72h) might be associated to their maturative status in the moment of seeding. Despite of the effect of time our trial did not reveal any consequences associated to time-monomer interaction between subjects, in terms of fertility. When analyzing the effect of monomer concentration, we can detect that the only significant results in the decrease of the fertility of worms, was for the flavan-3-ol Catechin at the maximum concentration (20 μ M), and compared to control plates. Contrary, a wide variability of results in terms of development (egg-hatching) was observed depending on each assay and monomer concentration. Statistically, the effect of time on percentages egg hatched was also found significant for the whole assays, but in case of Catechin and Epigallocatechin Gallate, so an effect of these monomers might be associated in the egg- hatching through time. The percentages showed a general increase of the egg-hatched associated to Catechin and Epigallocatechin Gallate. The effect of the interaction of the variable "time" and monomer was found statistically significant for the Hydrolysable Tannins, Gallic and Tannic acid as well as for the second assay with Flavone. Between subjects, statistical analyses were significant for the flavonols Quercetin and Rutin showing a general decrease on the percentage of development, as well as for Genistein and Flavone. Nevertheless significant results were found for Genistein 20 μ M, responsible of a light increase of percentage hatching respect to control. None of the percentages of reduction for egg-lying or/and egg-hatching were higher than 30%, so we cannot assume a consistent effect in any of the assays. In some cases these percentages were associated to an increase in the egg-laying ratio or egg hatching, more evident in case of the flaval- 3-ols: Catechin and Epigallocatechin gallate on egg-hatching rate. Previous results of the anthelmintic effects of condensed tannins on GINs had confirmed a relationship between structure and activity, showing that prodelphinidin and galloyl-derivatives were more effective than the procyanidin monomers (Brunet and Hoste, 2006;

Brunet et al., 2008), suggesting the important role of the free hydroxyl groups of CT monomers in the monomers-GINs interactions. Based on these features and the already-know AH activity (Molan et al., 2003, 2004), we included in our trial the flavan-3-ols Catechin and Epigallocatechin Gallate. Catechin belongs to procyanidins the principal units of CTs (Mueller-Harvey, 2006), while Epigallocatechin-gallate, results from the addition phenolic compounds and Gallic acids (Hagerman, 2002a), conferring them different properties, as protein binding (Aerts et al., 1999; Mueller-Harvey, 2006). Both are associated with an AH activity in egg-hatching GINs (Molan et al.; 2003), being the galloyl the most effective in terms of AH properties (Molan et al., 2003, Brunet and Hoste 2006). In our case, both showed an effect in the decrease of egg lying but an increase on percentages of development, independently to their concentration, even though none of the percentages were higher than 30%, being, the only statistical significant data for Catechin 20 μ M, in the fertility decrease. In this case flavanols, showed a negative correlation for fertility and development in a Moderate level. So the decrease in worms' fertility and the increase in percentages of development, depending on monomer concentration would explain the 46.8% of the cases. This could be associated to results confirmed in other studies where EGCG showed an effective antioxidant properties in lifespan and aging in *C. elegans* (Brown, et al., 2006; Zhang et al., 2009). In the other hand, Quercetin was also associated to the prolongation of *C. elegans* lifespan, the increase of resistance to oxidative stress and scavenger activity against free oxygen radicals (Kampkötter et al., 2008; Pietsch et al., 2009). The toxicity of gallo and condensed tannins on *C. elegans* behavior declining pharyngeal pumping or modifying life span in a closed activity structure relationship, has been also reported to have dependency on molecular sizes (Yamasaki et al., 2002). In case of the Dihydrochalcones neither Phloretin nor Phloridzin (Phloridzin it is a Phloretin derivate attached to a glucosidic group) (Gosch, 2010), were found to have any specific activity against fertility nor development. The Hydrolysable tannin (HTs), Tannic acid, showed effectiveness against egg-hatching and a very good negative correlation of egg-hatching and egg-lying that would explain the relative decrease on egg-lying behavior as the egg-hatching seems to increase. In the same way, other authors have reported an inhibition on the reproduction and motility of *C. elegans* after the contact to a mixture of HTs from *Quercus petraea* bark (Katiki et al., 2012), as well as effects on life-span prolongation after the exposure to a low concentration to tannic acid (TA) (Saul et al., 2010). A moderate effectiveness for the Flavone and Isoflavones was also noticed, to have an effect on worm fertility decrease for FLA5. After this experience in general terms, we were able to evaluate the main effects on functional activities such as egg-lying behavior and egg-hatching. The exposure of *C. elegans* to our monomers in our experimental design, did not seem to highly alter egg-lying, contrary, egg-hatching might be affected, showing and increased or decreased in the incoming of second generation. Even though, difficulties on data analysis, were associated to the low number of replications, so more replications are needed to obtain a wide results data file with a powerful statistical results, that will require also a better and higher level of organization to in terms of handling.

5. Conclusions

The solid Nematode Growth Medium offers a good and feasible lab *in vitro* experience to analyse the effect of secondary metabolites against *C. elegans* fertility, in egg-laying and egg-hatching behavior. It also seems to be a good resource that might help us to better understand the way of actions of anthelmintic drugs against GINs. The use of methanol as solvent for some of the monomers was considered to have a low toxicity against *C. elegans*. Any antibacterial activity against *E. coli* OP50 was detected. Difficulties on data analysis, were associated to the low number of replications, so more replications are needed to obtain a wide results data file in order to obtain stronger statistical results.

6. Acknowledgments

7. References

- Altun, Z.F., Herndon, L.A., Crocker, C., Lints, R., Hall, D.H. 2012. WormAtlas, (ed.s) 2002-2010. <http://www.wormatlas.org>
- Brown, M.K., Evans, J.L., Luo, Y., 2006, Beneficial effects of natural antioxidants EGCG and [alpha]-lipoic acid on life span and age-dependent behavioral declines in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 85, 620-628.
- Brunet, S., Hoste, H., 2006, Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7481-7487.
- Brunet, S., Jackson, F., Hoste, H., 2008, Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *International Journal for Parasitology* 38, 783-790.
- Bull, K., Cook, A., Hopper, N.A., Harder, A., Holden-Dye, L., Walker, R.J., 2007, Effects of the novel anthelmintic emodepside on the locomotion, egg-laying behaviour and development of *Caenorhabditis elegans*. *International Journal for Parasitology* 37, 627-636.
- Bürglin, T.R., Lobos, E., Blaxter, M.L., 1998, *Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes. *International Journal for Parasitology* 28, 395-411.
- Dugé de Bernonville, T., Guyot, S., Paulin, J.-P., Gaucher, M., Loufrani, L., Henrion, D., Derbré, S., Guilet, D., Richomme, P., Dat, J.F., Brisset, M.-N., 2010, Dihydrochalcones: Implication in resistance to oxidative stress and bioactivities against advanced glycation end-products and vasoconstriction. *Phytochemistry* 71, 443-452.
- Geary, T.G., Thompson, D.P., 2001, *Caenorhabditis elegans*: how good a model for veterinary parasites? *Veterinary Parasitology* 101, 371-386.
- Gosch, C., 2010, Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry* 71, 838-843.
- Hart, A.C., 2006, Behavior, In: *Wormbook. The C. elegans Research community.*, Massachusetts General Hospital Cancer Center, Charlestown, MA 02129 USA.
- Hiepe, T., Lucius, R., Gottstein, B., 2006, *Parasitología general. Con principios de inmunología, diagnóstico y lucha antiparasitaria*, Editorial ACRIBIA, S.A. Edition Zaragoza (España), 600 p.
- Holden-Dye, L., Walker, R.J., 2007, Anthelmintic drugs.

- Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Bruneta, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., 2012, Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006, The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology* 22, 253-261.
- Hotez, P., Hawdon, J., Schad, G.A., 1993, Hookworm larval infectivity, arrest and amphiparatensis: The *Caenorhabditis elegans* Daf-c paradigm. *Trends in Parasitology* 9, 23-26.
- Kampkötter, A., Nkwonkam, C.G., -, R.F.Z., Timpel, C., Chovolou, Y., Wätjen, W., Kahl, R., 2007, Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Arch Toxicol* 81, 849-858.
- Kampkötter, A., Timpel, C., Zurawski, R.F., Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P., Wätjen, W., 2008, Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 149, 314-323.
- Katiki, L.M., Ferreira, J.F.S., Zajac, A.M., Masler, C., Lindsay, D.S., Chagas, A.C.S., Amarante, A.F.T., 2011, *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintics for veterinary use. *Veterinary Parasitology* 182, 264-268.
- Manolaraki, F., Sotiraki S., Stefanakis A., Skampardonis V., Volanis M., Hoste H., 2010, Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitol. Res.* 137, 685-696.
- McGaw, L.J., Van der Merwe, D., Eloff, J.N., 2007, In vitro anthelmintic, antibacterial and cytotoxic effects of extracts from plants used in South African ethnoveterinary medicine. *The Veterinary Journal* 173, 366-372.
- Mitreva, M., Blaxter, M.L., Bird, D.M., McCarter, J.P., 2005, Comparative genomics of nematodes. *Trends in Genetics* 21, 573-581.
- Pietsch, K., Saul, N., Menzel, R., Stürzenbaum, S., Steinberg, C., 2009, Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology* 10, 565-578.
- Sangster, N.C., Gill, J., 1999, Pharmacology of Anthelmintic Resistance. *Parasitology Today* 15, 141-146.
- Saul, N., Pietsch, K., Menzel, R., Stürzenbaum, S.R., Steinberg, C.E.W., 2010, The Longevity Effect of Tannic Acid in *Caenorhabditis elegans*: Disposable Soma Meets Hormesis *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65A, 626-635.
- Silva, M.M., Santos, M.R., Caroço, G., Rocha, R., Justino, G., Mira, L., 2002, Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids: A Re-examination. *Free Radical Research* 36, 1219-1227.
- Smith, R., Pontiggia, L., Waterman, C., Lichtenwalner, M., Wasserman, J., 2009, Comparison of motility, recovery, and methyl-thiazolyl-tetrazolium reduction assays for use in screening plant products for anthelmintic activity. *Parasitology Research* 105, 1339-1343.

- Stiernagle, T. 2006. Worm Book. The online review of *C.elegans* Biology. In Maintenance of *C. elegans* (Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455 USA).
- Strange, K., 2006, *C. elegans: Methods and Applications*, Vol 351. Human Press Inc., Totowa, NJ.
- Sulston, J., Hodgkin, J., 1988, *The Nematode Caenorhabditis elegans*. W.B. Wood, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 587 p.
- Thompson, D.P., Klein, R.D., Geary, T.G., 1996, Prospects for rational approaches to anthelmintic discovery. *Parasitology* 113, 217-238.
- Waterman, C., Smith, R.A., Pontiggia, L., DerMarderosian, A., 2010, Anthelmintic screening of Sub-Saharan African plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 127, 755-759.
- Wood, W.B., 1988, *The Nematode Caenorhabditis Elegans*, 667 p.
- Yamasaki, T., Sato, M., Mori, T., Mohamed, A.S.A., Fujii, K., Tsukioka, J., 2002, Toxicity of tannins towards the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* and the brine shrimp *Artemia salina* *Journal of natural toxins* 11, 165-171.
- Zhang, L., Jie, G., Zhang, J., Zhao, B., 2009, Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. *Free Radical Biology and Medicine* 46, 414-421.

Table 1. Assays organization, commercial purified monomers and solvents in a solid NGM plates: Monomers: (Q) Quercetin, (R) Rutin, (C) (+)-Catechin hydrate, (EGCG) (-)-Epigallocatechin Gallate, (PTN) Phloretin, (PDN) Phloridzin Dihydrate, (GE) Genistein, (FLA) Flavone, (GA) Gallic acid, (TA) Tannic acid, (FLA'') (Flavone second assay). Control plates: (-) Methanol free, (+CH₄O) Methanol 0,002% Solvents: (PBS) Phosphate Buffer Solution, (CH₄O) Methanol maximum 0,002% of concentration.

	Assay 1 Flavonols	Assay 2 Flavanols	Assay 3 Chalcones	Assay 4 Isoflavones/ Flavone	Assay 5 Hydrolysable Tannins	Assay 6 Flavone
Monomer A	Q	C	PTN	GE	GA	FLA''
Monomer B	R	EGCG	PDN	FLA	TA	
Control	-	-	+CH ₄ O	+CH ₄ O	+CH ₄ O	+CH ₄ O
Solvent	PBS	PBS	CH ₄ O	CH ₄ O	CH ₄ O	CH ₄ O

Table 2. Spearman's rho: All fertilities addition// Average development Monomers: (Q) Quercetin, (R) Rutin, (C) (+)-Catechin hydrate, (EGCG) (-)-Epigallocatechin Gallate, (PTN) Phloretin, (PDN) Phloridzin Dihydrate, (GE) Genistein, (FLA) Flavone, (GA) Gallic acid, (TA) Tannic acid, (FLA'') (Flavone second assay).

	Q-R	EGCG-C	PTN-PDN	GA-TA	GE-FLA	FLA''- Control
Correlation Coefficient	0,231	-0,468	-0,615	-0,815	0,516	-0,119
Sig. (1-tailed)	0,214	0,046	0,013	0,000	0,029	0,389
N	14	14	13	14	14	8
<i>P-value</i>			*	*	**	**

* Correlation is significant at the 0.05 level (1-tailed).

** Correlation is significant at the 0.01 level (1-tailed).

Table 3. Partial Correlation: All fertilities addition// Average development Monomers: (Q) Quercetin, (R) Rutin, (C) (+)-Catechin hydrate, (EGCG) (-)-Epigallocatechin Gallate, (PTN) Phloretin, (PDN) Phloridzin Dihydrate, (GE) Genistein, (FLA) Flavone, (GA) Gallic acid, (TA) Tannic acid, (FLA'') (Flavone second assay)

Control Variables:							
All fertilities addition							
Average							
Partial Correlations	development	Q-R	EGCG-C	PTN-PDN	GA-TA	GE-FLA	FLA''- Control
Control Variables:	Correlation	-0,144	-0,466	-0,728	-0,556	0,184	-0,134
Monomer	Significance (1-						
concentration	tailed)	0,319	0,054	0,004	0,024	0,274	0,387
	df	11	11	10	11	11	5

Table 4. Percentages of reduction/increase of Commercial monomers: EL (Egg-lying) and EH (Egg-Hatching):
 **Reduction more than 30%, * Reduction between 29.99 and >20%. (I) Increase: Percentages higher than control.

	Fertility	EL	Percentages reduction/Increase	EH	Percentages reduction/Increase
Flavonols	Q20	-8,41	I	11,73	
	Q10	1,12		11,21	
	Q5	4,29		23,79	*
	R20	3,41		20,91	*
	R10	9,80		20,94	*
	R5	7,45		6,56	
Flavanoles	C20	24,72	*	-8,98	I
	C10	10,22		-19,46	I
	C5	18,26		-14,67	I
	EpGC20	-0,12	I	-18,16	I
	EpGC10	22,62	+	-20,40	I
	EpGC5	-10,31	I	-13,05	I
Chalcones	PTIN20	27,69	+	-15,51	I
	PTIN10	9,74		4,93	
	PTIN5	3,37		8,08	
	PDIN10	8,19		-2,95	I
	PDIN5	13,23		-8,03	I
Hydrolysable Tannins	GA20	2,97		-0,27	I
	GA10	12,77		-3,17	I
	GA5	4,55		3,92	
	TA20	14,49		-1,92	I
	TA10	7,17		4,39	
	TA5	-10,36	I <10%	14,25	
Isoflavones	G20	21,91	*	-2,30	I
	G10	14,03		17,36	
	G5	29,30	*	20,79	*
	FA20	11,49		17,81	
Flavones	FA10	9,49		5,11	
	FA5	30,27	**	15,81	
Flavones	FA20	-9,21	I	3,63	
	FA10	1,81		-4,04	I
	FA5	8,24		11,63	

CHAPTER 2: OBSERVING EFFECTS UNDER CONTROLLED CONDITIONS

ARTICLE 3: Study on the anthelmintic effect of carob pods and sainfoin hay when fed on lambs after experimental trickle infections with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*.

Authors

CELIA ARROYO-LOPEZ^{1,2}, FOTEINI MANOLARAKI², ANASTASIOS SARATSI¹, KATERINA SARATSI¹, ALEXANDROS STEFANAKIS¹, VASILEIOS SKAMPARDONIS¹, NIKOLAOS VOUTZOURAKIS¹, HERVÉ HOSTE², SMARAGDA SOTIRAKI^{1*}

¹Veterinary Research Institute – Hellenic Agricultural Organization Demeter, Thessaloniki, Greece.

²UMR 1225 IHAP INRA/ENVT, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex, France.

* corresponding author: smaro_sotiraki@yahoo.gr, tel +30 2310 365 373

***Parasite*, 21, 71, 1-8, (2014).**

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

Anthelmintic effect of carob pods and sainfoin hay when fed to lambs after experimental trickle infections with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*

Celia Arroyo-Lopez^{1,2}, Foteini Manolaraki², Anastasios Saratsis¹, Katerina Saratsi¹, Alexandros Stefanakis¹, Vasileios Skampardonis¹, Nikolaos Voutzourakis¹, Hervé Hoste², and Smaragda Sotiraki^{1,*}

¹ Veterinary Research Institute – Hellenic Agricultural Organization Demeter, 57001 Thermi, Thessaloniki, Greece

² UMR 1225 IHAP INRA/ENV, École Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex, France

Received 10 September 2014, Accepted 11 December 2014, Published online 22 December 2014

Abstract – The aim of the study was to compare the *in vivo* anthelmintic activity of sainfoin hay (*Onobrychis viciifolia*) and carob pod meal (*Ceratonia siliqua*) against gastrointestinal nematodes. Seven days before infection, 64 naive lambs were assigned to four different groups: Group S received sainfoin hay and group CAR was fed with carob pods. The remaining lambs received lucerne hay (*Medicago sativa*) and were assigned to positive (non-treated, NT) and negative (treated, T) control groups (treatment with albendazole). On day 0, lambs were artificially trickle infected for 6 weeks, with a mixture of infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. Parasitological and pathophysiological parameters were measured repeatedly during the 2-month study. Compared to the NT group, decreases in egg excretion were observed in the CAR and S groups with significant differences only found for sainfoin ($p < 0.05$). At necropsy, group S showed decreases in the total worm numbers of both nematode species with significant differences for *H. contortus*. In contrast, no differences were noticed for the CAR group. Compared to the NT group, lower values for fecundity of female *H. contortus* were found in the S and CAR groups, however differences were non-significant. No differences in body weight gains were found between groups. Consistent results were found showing significantly higher packed cell volume (PCV) values in the T and S groups compared to NT and CAR groups. Overall, these results confirm a positive effect associated with the feeding of lambs with tanniferous resources on host resilience (PCV values) and against gastrointestinal parasitic nematodes by affecting some biological traits of worm populations (e.g. eggs per gram of faeces and worm numbers). However, the anthelmintic effects differed between the two tannin-containing resources, which might be associated with the quantity and/or quality of secondary metabolites (condensed tannins and/or other polyphenols).

Key words: Gastrointestinal nematodes, Carob (*Ceratonia siliqua*), Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), Tannin Polyphenol, Nutraceuticals.

Résumé – Effet anthelminthique sur les agneaux des gousses de caroube et du foin de sainfoin dans l'alimentation, après infections expérimentales avec *Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis*. L'objectif de l'étude était de comparer l'activité anthelminthique *in vivo* du foin de sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) et des gousses de caroubier (*Ceratonia siliqua*) contre les nématodes gastro-intestinaux. Sept jours avant l'infection, 64 agneaux naïfs ont été répartis en quatre groupes : le groupe S a reçu du foin de sainfoin et le groupe CAR a été nourri avec des gousses de caroube. Les agneaux restants ont reçu du foin de luzerne (*Medicago sativa*) et ont été répartis en des groupes de contrôle, un groupe positif (non traité, NT) et un groupe négatif (traité, T) (traitement par l'albendazole). Au jour 0, les agneaux ont été artificiellement infectés pendant six semaines, avec un mélange de larves infectantes d'*Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis*. Les paramètres parasitologiques et physiopathologiques ont été mesurés à plusieurs reprises pendant les deux mois de l'étude. Par rapport au

*Corresponding author: smaro_sotiraki@yahoo.gr; sotiraki@vri.gr

Novel Approaches to the Control of Parasites in Goats and Sheep.

Invited editors: Hervé Hoste, Smaragda Sotiraki and Michel Alvinerie

groupe NT, une diminution de l'excrétion des œufs a été observée dans les groupes CAR et S, avec des différences significatives seulement pour le sainfoin ($p < 0.05$). À l'autopsie, le groupe S a montré une diminution du nombre total de vers de deux espèces de nématodes, avec des différences significatives pour *H. contortus*. En revanche, aucune différence n'a été remarquée pour le groupe CAR. Par rapport au groupe NT, des valeurs inférieures de fécondité des *H. contortus* femelles ont été trouvées dans les groupes S et CAR mais les différences n'étaient pas significatives. Aucune différence dans les gains de poids de corps n'a été trouvée entre les groupes. Des résultats cohérents ont été trouvés concernant les valeurs de l'hématocrite, significativement plus élevées dans les groupes T et S par rapport aux groupes NT et CAR. Dans l'ensemble, ces résultats confirment un effet positif lié à l'alimentation des agneaux avec des ressources à tannins, sur la résilience de l'hôte (valeurs d'hématocrite) et contre les nématodes gastro-intestinaux, en affectant certains traits biologiques des populations de vers (par exemple, œufs par gramme de fèces et nombres de vers). Toutefois, les effets antihelminthiques différaient entre les deux ressources contenant des tannins, ce qui pourrait être associé à la quantité et / ou à la qualité de métabolites secondaires (tannins condensés et / ou autres polyphénols).

1. Introduction

Gastrointestinal parasitic nematodes (GINs) strongly affect livestock health, welfare and production in small ruminants because of the major economic losses, clinical signs and possible deaths which they provoke. Until now, the main mode of control of these parasitic diseases relied on chemical anthelmintics (AHs). However, the prevalence of AH resistance within worm populations is now a worldwide phenomenon [15]. In addition, the societal demand to reduce chemicals in agriculture in order to avoid drug residues in animal products and the possible environmental consequences [21] are also increasingly considered. There is thus a strong impetus for research on alternative approaches to AH drugs [14]. Among those options, evidence has accumulated over the last 20 years to suggest that some bioactive tannin-rich (TR) plants have anthelmintic effects [12, 19]. Legume forages of the Fabaceae family, i.e.: sulla (*Hedysarum coronarium*) [25, 26], big trefoil (*Lotus pedunculatus*) or birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) [9, 25, 26], Sericea lespedeza (*Lepedeza cuneata*) [35, 39, 40], or sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) [9, 10, 20] have been widely explored. Several studies so far have supported the hypothesis that condensed tannins (CTs) [22, 23] and/or other flavonoids [3, 5] play a significant role in the AH effects of these forages when consumed by animals.

These different data illustrate the concept of nutraceuticals with AH properties [1]. It is generally assumed that the consumption of such forages at an appropriate threshold level of CTs reduces adult worm numbers in the animal through a direct action on the worm [17, 35]. However, this does not provoke their complete elimination *per se*. CTs when in contact with GI nematodes cause modulation of infection dynamics by affecting the biology of different key parasitic stages in the life cycle [11], namely egg excretion, L3 establishment by inhibiting or delaying exsheathment and/or tissue association/penetration supported *in vivo* by a decrease in larvae establishment [6, 17, 30] and possible reduced fertility of worms. The challenge of incorporating such plants in small ruminant production systems would be that when provided as animal feed, the animals will voluntarily eat them in sufficient quantities over time (at least 7 days) in order to successfully affect gastrointestinal parasite biology and ensure beneficial effects on health [13].

In Mediterranean areas, the consumption of local plants composing the rangelands traditionally represents a complementary food resource for livestock husbandry, where and when environmental conditions (e.g. drought) impose feed limits [7, 31]. The communities of plants within the Mediterranean rangelands have moderate to high contents of plant secondary metabolites (PSMs), including tannins [31]. In 2010, an *in vivo* study showed that several of these Mediterranean plants had bioactive properties and could potentially be used as nutraceuticals against GINs in small ruminants [19]. The list included *Pistacia lentiscus*, *Quercus coccifera*, *Castanea sativa* leaves, *Ceratonia siliqua* leaves and pods and sainfoin. The current study will focus on the possible use of a variety of nutraceuticals exploitable within the Mediterranean basin/area.

Sainfoin is a tannin-rich legume forage which can be found in the southern part of Europe and which has been the subject of renewed interest because of several beneficial properties in the context of agroecology. These include AH properties making sainfoin a model of legume forage used as nutraceuticals. Several *in vitro* studies have shown that sainfoin extracts have an effect against different GIN species in a dose-dependent manner [4, 19, 27]. *In vivo* AH effects have also been demonstrated on sheep and/or goats consuming sainfoin by showing a reduction in parasitic egg excretion related to a decrease of female worm fertility and/or of worm numbers depending on the nematode species [30, 41].

Following the same concept and in the area of research on forages, the potential of agro-industrial by-products to be used as nutraceuticals has also been explored. Amongst the potential candidates, carob pods have already drawn some attention since their nutritive value in sheep and goat nutrition has been demonstrated in several studies [32, 43]. In particular, as regards AH properties, Manolaraki et al. [19] obtained preliminary results from *in vitro* and *in vivo* studies in which significant decreases in egg excretion and worm burdens of *H. contortus* and *T. colubriformis* were observed in lambs fed with carob pod meal. Such results suggesting combined nutritive values and potential AH activity in carob pods indicate that this resource might represent a promising model of nutraceuticals derived from agro-industrial by-products.

As mentioned above, the comparison of the respective values of sainfoin vs. carob pods to disrupt the biology of parasitic

Table 1. Experimental design: animal diet regimes and/or anthelmintic treatment received according to the four different experimental groups (Total lambs $n = 64$).

Groups	Treatment	Animals
Positive control (NT)	Lucerne hay (<i>Medicago sativa</i>)	8 females + 8 males
Negative treated control (T)	Lucerne hay (<i>Medicago sativa</i>) + Albendazole drench	8 females + 8 males
Carob (CAR)	Carob pods (crushed) (<i>Ceratonia siliqua</i>)	8 females + 8 males
Sainfoin (S)	Sainfoin hay (<i>Onobrychis viciifolia</i>)	8 females + 8 males

nematodes relied on a single study in which the animals were experimentally infected with a single challenge of GINs, 2 weeks after the start of the specific diets [19]. Here, our general objective was to confirm previous results of this approach and to be closer to natural conditions of GIN infection, and thus exploring the effects of tannin-rich resources in a model of GIN trickle infections. The specific aims of the present study were: (1) to compare the antiparasitic activity of sainfoin hay and carob pods given as part of a concentrate meal under *in vivo* conditions in lambs which were experimentally trickle infected with two GIN species, (2) to confirm the benefits of these plants on host resilience by measuring certain production and pathophysiological parameters.

2. Materials and methods

2.1. Trial site

The trial was performed in Greece and precisely on the island of Crete where carob trees are indigenous and carob pod meal is commonly used as animal feed. The facilities hosting the experiment belonged to the Asomati Research Station of HAO Demeter involving animals of the experimental flock. The trial was performed according to welfare rules applied in Greece and its design was approved by the Institute's ethics committee.

2.2. Animals

Sixty-four (32 males and 32 females), 6-month-old, naïve lambs, of the most common local "Sfakion" breed (mean weight: 12.63 ± 0.2816 kg) were used in the trial. The animals were raised indoors under helminth-free conditions. In addition, 10 days before the start of the trial, they were drenched with albendazole at the commercially recommended dose (15 mg/kg). The effect of the treatment was recorded by coprological examination at the start of the study. No anthelmintic resistance was previously reordered in the specific location.

2.3. Feeding regimes and experimental design

Two tannin-containing plants were offered to the respective animal groups, the forage legume sainfoin provided as hay *ad libitum* and a meal supplement composed of carob pods. Carob pods were previously dried and crushed to obtain a sort of flour, incorporated in the feed supplement at a concentration of 11% which was the maximum possible (poor energy and protein contents). The free tannin forage lucerne (*Medicago*

sativa) hay was used as a control feed for the two extra control groups depending on whether they were drenched with albendazole (group T = negative control) or remained untreated (group NT = positive control) (Table 1). Group T mainly aimed at comparing the effects on resilience between the different infected groups. Refusals were recorded daily. Animals had free access to fresh water. In all the cases, the feed regimes were made isoenergetic and isoproteic and balanced for crude fibre, Ca and P.

Seven days prior to any experimental infection (D-7), the lambs were allocated to the four experimental groups (including 8 female and 8 male lambs per group). The animals were then kept separately per group and the different feeding regimes were applied for 70 days (from D-7 to D63) (Fig. 1). On Day 0 (D0), all animals were experimentally infected *per os* with a mixture of infective third-stage (L3) larvae of *H. contortus* (1000 L3) and *T. colubriformis* (700 L3) given weekly for six consecutive weeks to mimic a natural infection rate [35]. Infective (L3) larvae were cultured from the faeces of monospecifically infected donor lambs and were kept at optimal conditions until infection (4 °C). The age of the larvae at D0 was approximately 2 months in order to ensure infectivity [18].

2.4. Parasitological and pathophysiological measurements

Individual measurements were recorded to characterize the effects of the feed on worm biology by evaluating parasitological measurements either *in vivo* (faecal egg excretion) or during the *post mortem* procedures (worm counts and female worm fertility). In addition, measurements were performed to estimate host resilience through production measurements (Body Weight Gain rate [BWG]) by recording the weight at the beginning (D0) and at the end (D63) of the trial and pathophysiological measurements: (Packed Cell Volume [PCV] and serum inorganic phosphate values).

Individual faecal samples were collected weekly directly from the rectum, from D(-7) when the adaptation of diet started, until the end of the assay (D63) to determine faecal egg counts (FECs) according to a modified McMaster technique [33]. Data were expressed as eggs per gram of faeces (EPG).

Individual blood samples were taken fortnightly (D0, D14, D28 and D42) during the trial. Blood was taken by venipuncture of the jugular vein and collected in heparin and heparin-free tubes. The first tubes were used to measure Packed Cell Volume (PCV) according to the microhaematocrit method. Serum was collected from heparin-free tubes, separated and

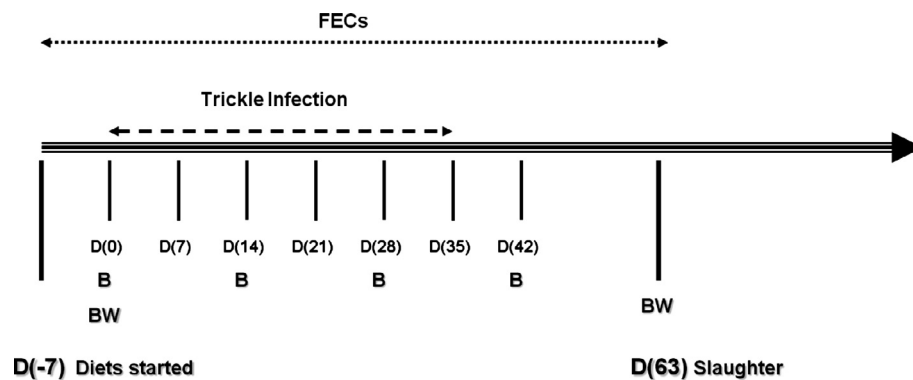


Figure 1. Experimental design: D(-7): animal distribution into feeding regime groups. D(0): start of a weekly trickle infection of *H. contortus* and *T. colubriformis* for 6 weeks D(7), D(14), D(21), D(28), D(35) and D(42). D(63): slaughter and necropsy of 8 male lambs par group. Measurements of BW: body weight were performed on D0 and D63, FECs: faecal egg counts (weekly) and B: blood sampling to measure PCV (fortnightly).

frozen to determine inorganic phosphate values using a photometric assay [34].

On D63 (end of the assay), only lamb males were slaughtered (8 animals per group) and the female lambs were drenched with albendazole at the commercial recommended dose (15 mg/Kg) and returned to the flock. After necropsy, total adult worm burdens and fertility of female worms for the two nematode species (*H. contortus* and *T. colubriformis*) were evaluated from the abomasum and small intestine [8]. At necropsy, the gastrointestinal tracts were immediately removed and the abomasa and small intestines were gently washed to collect the luminal contents. Moreover, the abomasal mucosa were digested using a pepsin digestion procedure, after 4 h of incubation in a pepsin solution at 37 °C in order to obtain the larval stages.

Worm counts were performed according to a 10% aliquot technique. Identification of worm stages, sex and species were conducted using a standard procedure [18]. Thereafter, the fertility of the female worms was evaluated from 10 females per lamb of *H. contortus* and/or *T. colubriformis*. The fertility of *T. colubriformis* was estimated by the direct counting of eggs *in utero* after clearance with lactophenol. For *H. contortus*, the fertility was determined according to the method described by Kloosterman et al. [16].

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed to compare the values for BWG and pathophysiological measurements in the four experimental groups (using both T and NT controls as positive and negative indicators). For the parasitological parameters (namely EPG, worm counts and female worm fertility), the statistical analyses were restricted to the three infected groups (namely NT, CAR and S groups). The group treated with AH (T group), although FECs were also recorded in the same time intervals to ensure efficacy, was excluded from this analysis. In addition, the values of FECs, worm burden and fertility of females data were $\log_{10}(X + 1)$ transformed before statistical analysis in order to normalize the distribution. Lastly, the analyses of worm fertility were restricted to *H. contortus*

because of the patchy distribution and insufficient number of *T. colubriformis* worms in many lambs of the different experimental groups. All analyses were performed by using SYSTAT 9.0 Software. AUC values for the EPGs of each animal were calculated using Graphpad Prism software for Windows (version 5.01). AUC values were compared by using one-way analysis of variance (ANOVA) and *post hoc* comparisons with Bonferroni adjustment.

For the worm counts (*H. contortus*, *T. colubriformis* and total number [total of both nematode species]), the differences in worm burden mean number and fertility were examined by using ANOVA after $\log(WN + 1)$ transformation of the data. Similarly, an ANOVA 2 was applied to examine the differences in egg count per female *H. contortus* worms taking into account the treatment and the individual animal.

To compare the differences in body weight gains, ANOVA was performed on the BW rates calculated between D-7 and D63. For log transformed FECs, PCV and inorganic phosphate values, the statistical comparisons were first performed by use of repeated measures ANOVA completed by a date-to-date one-way analysis of variance (ANOVA), including *post hoc* tests with Bonferroni correction. For PCV, because of initial differences on D0, the date-by-date analysis was performed by using the D0 values as covariate.

3. Results

3.1. Parasitological parameters

3.1.1. Egg excretion

Analyses of the egg excretion values based on the Analysis of Variance on Repeated Measures have shown overall differences close to significance ($P < 0.06$) between the CAR, S and NT groups (Fig. 2). The values of FEC in the sainfoin were regularly lower compared to those of the NT group, followed by the values of lambs receiving carob. Results of the date-by-date analyses were significant only on D42 and D63 ($P < 0.05$) with the values in the sainfoin group differing from those in the NT group. On these two dates, the percentage of

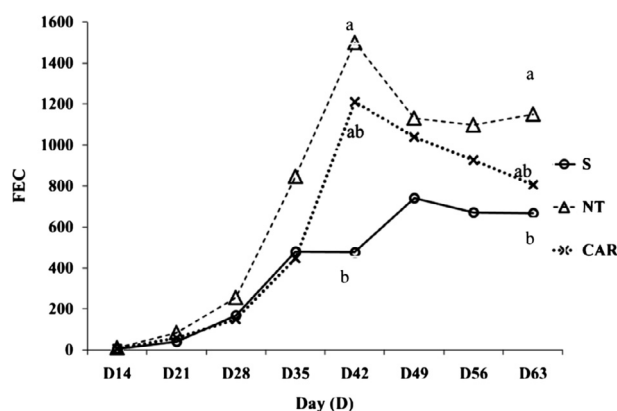


Figure 2. Faecal egg counts (arithmetic mean of eggs per gram of faeces) based on the different diet regimes over the study period (D14–D63). S (sainfoin), NT (non-treated/positive control), CAR (carob).

egg reduction was measured using the following formula: $\% \text{Reduction} = ((\text{Total amount C} - \text{Total amount Treated}) / \text{Total amount Control}) \times 100$. Compared to the NT (positive control) groups fed with lucerne (*Medicago sativa*), the results showed a reduction of -68% for the S group and of -19% for the CAR group on D42. On D63, these reductions in EPGs were, respectively, -42% and -30% for the S and the CAR groups.

The mean AUC value (indicator of total number of eggs excreted) for S group (29,662.5, SD \pm 15,103.3) was reduced by 46.93% compared to the NT group (38,456.25, SD \pm 27,873.2) which was significantly different ($p = 0.034$). As regards the CAR group, although the mean AUC value (20,405, SD \pm 10,764.72) was reduced by 22.86% compared to the NT group, this reduction was not significantly different ($p = 0.614$).

As regards group T, the mean FECs throughout the study were 1.25, 0, 0, 6.25, 10, 17.5, 16.25 and 37.5 for sampling dated D14 to D63, respectively.

3.1.2. Worm counts

The total mean worm burdens (Fig. 3) for *H. contortus* (Hc) and *T. colubriformis* (Tc), found at necropsy per group (8 males), were respectively: 72 ± 87 (Hc: 26 ± 44 ; Tc: 46 ± 88) in group T; 295 ± 241 (Hc: 185 ± 109 ; Tc: 110 ± 200) in group S; 442 ± 201 (Hc: 257 ± 164 ; Tc: 185 ± 140) in group CAR, and 556 ± 289 (Hc: 335 ± 131 ; Tc: 221 ± 259) in group NT. The number of worms in the treated group (T) differed significantly from the three others. A trend ($p < 0.11$) was found for a reduced total worm number in the S group compared to the NT controls. No significant differences were found in the number of *H. contortus* between the three treated groups, but a significant reduction ($p < 0.05$) was measured in the number of *T. colubriformis* between the S vs. the NT groups. When compared to the NT control groups, the percentages of reductions were respectively -45% for *H. contortus* and -50% for *T. colubriformis*, in the S group and only -23% and -16% for the CAR group (Fig. 3).

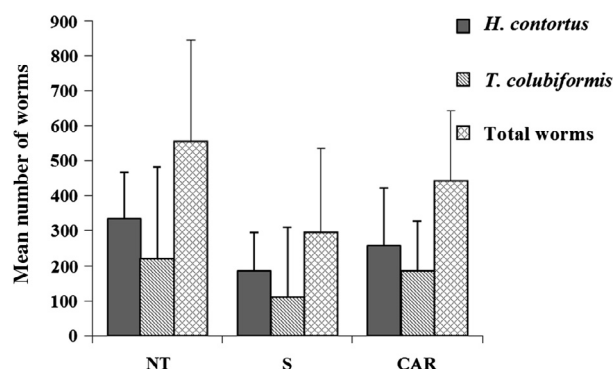


Figure 3. Mean number of worms of the two nematode species recovered and of the total worm number in the different experimental groups. S (sainfoin), NT (non-treated/positive control), CAR (carob).

3.1.3. Fertility of female worms

The mean values of female *H. contortus* fertility were respectively 91 eggs per female in the control NT group, 75 in the S group, and 67 in the CAR group. These differences were non-significant.

Because the mean number of *T. colubriformis* was low and highly variable between animals per group it was not possible to evaluate any statistical difference in the female fertility for this intestinal species.

3.2. Production measurements

Overall, the animals were well adapted to the feed offered and no refusals were recorded until the end of the study.

The BWG calculated over the 70-day experimental period was respectively 4.16 (SD \pm 0.89) kg for group NT, 4.72 (SD \pm 0.77) kg for group C, 4.69 (SD \pm 0.81) kg for group CAR and 4.81 (SD \pm 1.01) kg for group S. No statistical differences between groups were found depending on their diet for the BWGs, comparing initial and final BW data, although S group showed a 13.7% higher BWG than animals in the control group. Nonsignificance was documented when the final BWs of the treated groups were compared to the NT control group.

3.3. Pathophysiological parameters

The analysis of variance on repeated measurements for PCV values (from D14 to D56) revealed overall statistical differences between the groups ($p < 0.001$; Table 2). In addition, when the date-by-date ANOVA 1 was applied, using the D0 values as covariate, statistical differences ($p < 0.05$) were found between groups on each date ($p < 0.01$). In contrast to the control negative (T) group, which showed repeatedly the highest PCV values, the values in S group were found to be statistically different only on D28. All values and statistical differences found in different groups are presented in Table 2.

Table 2. Packed Cell Volume values (PCV) (normal style) and serum inorganic phosphate values (*italics*) on the different specific days of the trial (\pm SD). NT = positive control, T = treated, negative control, S = sainfoin fed group; CAR = Carob fed group. Different superscripts in the same column indicate significant differences.

Group/day	D0	D14	D28	D42	D56
(NT) Untreated control+	35.4 ^{ab} \pm 4.6 <i>6.8 \pm 1.4</i>	30.0 ^b \pm 3.2 <i>7.4 \pm 1.3</i>	29.4 ^c \pm 3.7 <i>6.8 \pm 0.8</i>	32.8 ^b \pm 4.5 <i>10.0^a \pm 2.0</i>	28.4 ^b \pm 2.1 <i>8.0 \pm 1.4</i>
(T) Treated control–	38.7 ^{ab} \pm 6.0 <i>5.2 \pm 1.2</i>	38.6 ^a \pm 4.2 <i>8.3 \pm 1.8</i>	38.1 ^a \pm 4.3 <i>6.1 \pm 1.7</i>	41.9 ^a \pm 4.3 <i>8.5^b \pm 1.8^b</i>	33.6 ^a \pm 4.1 <i>8.2 \pm 2.5</i>
(CAR) carob	34.8 ^b \pm 2.8 <i>7.1 \pm 1.4</i>	30.6 ^b \pm 3.9 <i>8.1 \pm 1.5</i>	29.6 \pm 4.2 <i>7.0 \pm 2.4</i>	33.4 \pm 2.5 <i>8.2^b \pm 1.6</i>	29.6 ^b \pm 2.4 <i>7.6 \pm 1.1</i>
(S) sainfoin	43.2 ^a \pm 6.8 <i>5.7 \pm 1.8</i>	34.6 ^a \pm 5.0 <i>8.9 \pm 1.7</i>	32.8 ^b \pm 5.1 <i>6.7 \pm 1.4</i>	37.9 ^a \pm 4.0 <i>7.6^b \pm 1.2</i>	32.5 ^a \pm 3.9 <i>7.0 \pm 0.9</i>

Unlike for PCV, the inorganic phosphate serum concentration records showed wide variability in values and few statistical differences between groups except on D42, when significant differences were found between the NT lambs and the three other groups ($p < 0.01$) (Table 2).

4. Discussion

The general objective of our study was to compare the effects of feed based on carob pods and sainfoin hay on the worm populations and the host resilience of infected lambs. This comparison aimed at evaluating the potential exploitation as nutraceuticals of two types of local TR resources (a legume forage vs. an agro-industrial by-product) in the same conditions of ruminant breeding and GIN infections. This aims at complementing results of a previous study [19] that was performed with similar objectives. However, this first study was performed based on a single initial infection with both GIN species. In this study, we aimed at confirming the previous results under conditions which better mimic the natural conditions of infection in order to prepare future implementation under farm conditions. One of the interests of the comparison is due to the fact that we used the same tannin-rich resources in both studies.

Egg excretion (EPG) was the main parasitological measurement performed *in vivo* in the different groups. The results showed some regular decreases in the mean values of EPG in the CAR and S groups compared to the NT group. However, statistical differences were only recorded between the S and NT groups. These results with sainfoin corroborate previous ones illustrating that one of the main effects in lambs or kids related to the consumption of a range of tannin-rich legume forages was a decrease in nematode egg output [10, 24, 41, 42]. Previous results on the effects of carob pods in GIN infected small ruminants are less abundant than with sainfoin. In the previous study [19], significant decreases in FEC were also measured in the lambs fed on carob pods. Here, although some reductions in egg output were measured (based on direct analyses of the egg excretion and the area under the curve), the differences to the control groups were non-significant.

We aimed at analysing the origin of these decreases in egg excretion based on necropsy data. They concerned both worm numbers and female worm fertility for the two GIN species as performed in previous studies [19, 29]. Here, the decreases in

EPG in the S group compared to the NT controls were associated with a trend for a decreased total worm burden which was mainly related to a significant reduction in the number of intestinal worms but with no effect in the number of *H. contortus*. In contrast, no significant differences were observed in worm numbers or in worm fertility in the carob group. This is consistent with the lack of significant differences in EPG in the CAR vs. the NT groups.

A higher AH effectiveness of some tannin-containing plants against intestinal worm species, such as *T. colubriformis*, has already been found for sainfoin in goats [29] and lambs. Higher susceptibility of intestinal species compared to abomasal ones to the effects of tannin-rich resources has also been described with quebracho [2]. However, some other reports mentioned a higher susceptibility to TR resources for abomasal species when compared to intestinal ones [12]. Such contradictory results on plant-AH effects between abomasal vs. intestinal GIN species and/or location need to be further studied.

In the previous research results [19], significant reductions were measured in the female fertility of *T. colubriformis* in lambs fed with carob and on both *T. colubriformis* and *H. contortus* in lambs receiving sainfoin. The current results indicated in the case of *H. contortus*, fertility values which were lower by 25.8% and 18% for the *C. siliqua* and *O. viciifolia* fed regime, respectively, when compared to the worms collected in the NT control lambs fed on *M. sativa*. However, these differences were non-significant. It is worth noting that, when compared to the values observed in the first study, the mean number of eggs per female *H. contortus* was low, even in the control group, and the low and highly variable number of worms. Unfortunately, the heterogeneous prevalence of *T. colubriformis* in the lambs did not allow any statistical comparisons on the fertility of the female *T. colubriformis*.

It is suspected that such diversity in results (effects on both worm numbers and/or female worm fertility) between the two studies on carob pods and sainfoin hay might be explained to some degree by (i) differences in the infection regimes (single vs. trickle) which involved different nematode stages being subjected to the direct effects of tannin-containing resources, or (ii) by possible consequences on immune host response. Clearly, on the one hand, a single infection combined with the consumption of TR resources targeted the established adult worm populations [19], and on the other, a mode of trickle infections, as in the current study, exposed different parasite life stages (from L3 to adult worms) to the action of

tannin-containing resources. In addition, it is suspected that the trickle mode of infection, which was applied in the current study, was better designed to stimulate local host immune responses [13, 42] which are less favoured in case of the single mode of infection.

Evidence obtained from *in vitro* assays with the addition of PVPP (an inhibitor of polyphenols, namely tannins and flavonoids) suggests a key role for these plant secondary metabolites in the AH properties for both sainfoin and carob waste pods [19]. Subsequently, different effects on biological functions or traits of different parasitic stages could be expected [12].

Contradictory results have been described about the effects of carob on body host performance and physiology. Recent results revealed no differences in body performances, voluntary intake and body gain rate for adult lambs fed with carob pods, in contrast to control groups [28]. This contrasts with previous results where body performance was compromised, by carob pulp feeding [32] due to the possible adverse effects of CTs in carob pods [36, 37]. These differences may depend on qualitative and/or quantitative differences of carob fruits (example: pulp, pod or flour) [28]. In our study, carob pods comprising the pods were used to obtain a powder and no differences were found in body gain rate between groups, although the sainfoin groups showed a 13.7% increase in live weight gain compared to the control ones. This last result confirmed previous ones obtained by comparing sainfoin and lucerne groups in ruminants [44].

Two pathophysiological measurements were performed to evaluate the impact of carob pods and sainfoin hay on host resilience, in order to withstand the negative effects of GINs. They were respectively related to *Haemonchus* (PCV) and *Trichostrongylus* (serum inorganic phosphate) infections. Statistical differences in the mean PCV values were found throughout the assay with, overall, higher values in the S and T groups compared to the CAR and NT lambs. These results with sainfoin tend to confirm previous data suggesting positive effects of the consumption of tannin-containing legume forages on the resilience of animals [25, 29]. In contrast to PCV, the analyses of inorganic phosphate levels showed high variability in values and the comparisons between groups were not consistent. Reductions in seric phosphate levels have been associated with worm infection of the small intestine, particularly with *Trichostrongylus* sp. [29]. The decreases in phosphate absorption have been related to the damage induced to the intestinal mucosae (abrasion of villi, alteration of epithelial cells and of their equipment in digestive enzymes). The low level of mean infection and the variability of infection observed with *T. colubriformis* between individual lambs are probably two main reasons explaining the lack of any trend observed between experimental groups in the phosphate values observed in the current study.

In summary, results of the current study (1) tend to confirm an effect after administration of both tannin-rich resources (although stronger for sainfoin) on egg excretion and subsequent pasture contamination as a likely outcome; (2) demonstrate that significant effects were obtained in the sainfoin group on worm numbers particularly on *T. colubriformis* ($p < 0.05$). This might be explained by reduced L3 establishment in early parasitic stages; (3) reveal that the AH effects

were less consistent (and usually non-significant) with carob, potentially due to the limitations of its concentration in the ratio (high level of sugar but low proteins and lipids).

5. Conclusions

The importance of the use of local forages, plant parts or plant extracts in helminth control relies on their sustainable and environmental qualities [38]. Experience on the antiparasitic effect of *Ceratonia siliqua* remains rare. Due to the difficulties and the amount of variables that could interfere with pathophysiological, parasitological and body performance results, further investigations are needed to confirm the AH effects hypothesis and the type of secondary metabolites involved in the use of carob as a nutraceutical.

Acknowledgements. This study was supported by funding from Marie Curie Research Fellow (Healthy Hay Project) and COST-STSM-FA0805 – CAPARA – project. The authors also gratefully acknowledge funding from the European Community financial participation under the Seventh Framework Programme for Research, Technological Development and Demonstration Activities, for the Integrated Project LOWINPUTBREEDS FP7-CP-IP 222623.

The views expressed in this publication are the sole responsibility of the author(s) and do not necessarily reflect the views of the European Commission. Neither the European Commission nor any person acting on behalf of the Commission is responsible for the use which might be made of the information contained herein.

References

1. Andlauer W, Fürst P. 2002. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, 35, 171–176.
2. Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology*, 99, 205–219.
3. Barrau E, Fabre N, Fouraste I, Hoste H. 2005. Effect of bioactive compounds from sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology*, 131, 531–538.
4. Brunet S, Aufrere J, El Babili F, Fouraste I, Hoste H. 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology*, 134, 1253–1262.
5. Brunet S, Hoste H. 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 7481–7487.
6. Brunet S, Jackson F, Hoste H. 2008. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *International Journal for Parasitology*, 38, 783–790.
7. Frutos P, Moreno-Gonzalo J, Hervas G, García U, Ferreira LM, Celaya R, Toral PG, Ortega-Mora LM, Ferre I, Osoro K. 2008. Is the anthelmintic effect of heather supplementation to grazing goats always accompanied by anti-nutritional effects? *Animal*, 2, 1449–1456.

8. Hansen J, Perry BD. 1994. The epidemiology, diagnosis, and control of helminth parasites of ruminants: a handbook. International Laboratory for Research on Animal Diseases: Nairobi, Kenya. 171 p.
9. Heckendorn F, Haring DA, Maurer V, Senn M, Hertzberg H. 2007. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Veterinary Parasitology*, 146, 123–134.
10. Heckendorn F, Haring DA, Maurer V, Zinsstag J, Langhans W, Hertzberg H. 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Veterinary Parasitology*, 142, 293–300.
11. Hoste H, Arroyo Lopez C, Manolaraki F, Ojeda Robertos N, Sotiraki S, Torres Acosta JFJ. 2012. Strongyloses: Nouvelles approches: Parasitisme helminthique des ruminants: le paradoxe du pâturage? *Le Point Vétérinaire/Parasitologie interne des ruminants*, 11, 30–35.
12. Hoste H, Jackson F, Athanasiadou S, Thamsborg SM, Hoskin SO. 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*, 22, 253–261.
13. Hoste H, Martinez-Ortiz-De-Montellano C, Manolaraki F, Brunet S, Ojeda-Robertos N, Fourquaux I, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA. 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology*, 186, 18–27.
14. Hoste H, Torres-Acosta JF. 2011. Non chemical control of helminths in ruminants: adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary Parasitology*, 180, 144–154.
15. Jackson F, Varady M, Bartley DJ. 2012. Managing anthelmintic resistance in goats – can we learn lessons from sheep? *Small Ruminant Research*, 103, 3–9.
16. Kloosterman A, Albers GAA, Van Den Brink R. 1978. Genetic variation among calves in resistance to nematode parasites. *Veterinary Parasitology*, 4, 353–368.
17. Lange KC, Olcott DD, Miller JE, Mosjidis JA, Terrill TH, Burke JM, Kearney MT. 2006. Effect of *sericea lespedeza* (*Lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lambs. *Veterinary Parasitology*, 141, 273–278.
18. MAFF. 1986. Manual of veterinary parasitology laboratory techniques. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food: London. p. 160.
19. Manolaraki F, Sotiraki S, Stefanakis A, Skampardonis V, Volanis M, Hoste H. 2010. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology*, 137, 685–696.
20. Martinez-Ortiz-de-Montellano C, Arroyo-Lopez C, Fourquaux I, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H. 2013. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under *in vivo* and *in vitro* conditions. *Experimental Parasitology*, 133, 281–286.
21. McKellar QA. 1997. Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology*, 72, 413–435.
22. Molan AL, Alexander RA, Brookes IM, Mc Nabb WC. 2000. Effect of an extract from Sulla (*Hedysarum coronarium*) containing condensed tannins on the migration of three sheep gastrointestinal nematodes *in vitro*. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 60, 21–25.
23. Molan AL, Meagher LP, Spencer PA, Sivakumaran S. 2003. Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology*, 33, 1691–1698.
24. Niezen JH, Charleston WA, Robertson HA, Shelton D, Waghorn GC, Green R. 2002. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 105, 229–245.
25. Niezen JH, Robertson HA, Waghorn GC, Charleston WA. 1998. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. *Veterinary Parasitology*, 80, 15–27.
26. Niezen JH, Waghorn TS, Charleston WAG, Waghorn GC. 1995. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *Journal of Agricultural Science*, 125, 281–289.
27. Novobilsky A, Stringano E, Hayot Carbonero C, Smith LM, Enemark HL, Mueller-Harvey I, Thamsborg SM. 2013. *In vitro* effects of extracts and purified tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against two cattle nematodes. *Veterinary Parasitology*, 196, 532–537.
28. Obeidat BS, Alrababah MA, Abdullah AY, Alhamad MN, Gharaibeh MA, Rababah TM, Abu Ishmais MA. 2011. Growth performance and carcass characteristics of Awassi lambs fed diets containing carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). *Small Ruminant Research*, 96, 149–154.
29. Paolini V, De La Farge F, Prevot F, Dorchies P, Hoste H. 2005. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 127, 277–283.
30. Paolini V, Dorchies P, Hoste H. 2003. Effects of sainfoin hay on gastrointestinal nematode infections in goats. *Veterinary Record*, 152, 600–601.
31. Papachristou TG, Dziba LE, Provenza FD. 2005. Foraging ecology of goats and sheep on wooded rangelands. *Small Ruminant Research*, 59, 141–156.
32. Priolo A, Lanza M, Biondi L, Pappalardo P, Young OA. 1998. Effect of partially replacing dietary barley with 20% carob pulp on post-weaning growth, and carcass and meat characteristics of Comisana lambs. *Meat Science*, 50, 355–363.
33. Raynaud JP. 1970. Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équins et porcins. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 45, 321–342.
34. Robinson R, Roughan ME, Wagstaff DF. 1971. Measuring inorganic phosphate without using a reducing agent. *Annals of Clinical Biochemistry*, 8, 168–170.
35. Shaik SA, Terrill TH, Miller JE, Kouakou B, Kannan G, Kaplan RM, Burke JM, Mosjidis JA. 2006. *Sericea lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Veterinary Parasitology*, 139, 150–157.
36. Silanikove N, Landau S, Or D, Kababya D, Bruckental I, Nitsan Z. 2006. Analytical approach and effects of condensed tannins in carob pods (*Ceratonia siliqua*) on feed intake, digestive and metabolic responses of kids. *Livestock Science*, 99, 29–38.
37. Silanikove N, Perevolotsky A, Provenza FD. 2001. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative post-ingestive effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 69–81.

tannin-containing resources. In addition, it is suspected that the trickle mode of infection, which was applied in the current study, was better designed to stimulate local host immune responses [13, 42] which are less favoured in case of the single mode of infection.

Evidence obtained from *in vitro* assays with the addition of PVPP (an inhibitor of polyphenols, namely tannins and flavonoids) suggests a key role for these plant secondary metabolites in the AH properties for both sainfoin and carob waste pods [19]. Subsequently, different effects on biological functions or traits of different parasitic stages could be expected [12].

Contradictory results have been described about the effects of carob on body host performance and physiology. Recent results revealed no differences in body performances, voluntary intake and body gain rate for adult lambs fed with carob pods, in contrast to control groups [28]. This contrasts with previous results where body performance was compromised, by carob pulp feeding [32] due to the possible adverse effects of CTs in carob pods [36, 37]. These differences may depend on qualitative and/or quantitative differences of carob fruits (example: pulp, pod or flour) [28]. In our study, carob pods comprising the pods were used to obtain a powder and no differences were found in body gain rate between groups, although the sainfoin groups showed a 13.7% increase in live weight gain compared to the control ones. This last result confirmed previous ones obtained by comparing sainfoin and lucerne groups in ruminants [44].

Two pathophysiological measurements were performed to evaluate the impact of carob pods and sainfoin hay on host resilience, in order to withstand the negative effects of GINs. They were respectively related to *Haemonchus* (PCV) and *Trichostrongylus* (serum inorganic phosphate) infections. Statistical differences in the mean PCV values were found throughout the assay with, overall, higher values in the S and T groups compared to the CAR and NT lambs. These results with sainfoin tend to confirm previous data suggesting positive effects of the consumption of tannin-containing legume forages on the resilience of animals [25, 29]. In contrast to PCV, the analyses of inorganic phosphate levels showed high variability in values and the comparisons between groups were not consistent. Reductions in seric phosphate levels have been associated with worm infection of the small intestine, particularly with *Trichostrongylus* sp. [29]. The decreases in phosphate absorption have been related to the damage induced to the intestinal mucosae (abrasion of villi, alteration of epithelial cells and of their equipment in digestive enzymes). The low level of mean infection and the variability of infection observed with *T. colubriformis* between individual lambs are probably two main reasons explaining the lack of any trend observed between experimental groups in the phosphate values observed in the current study.

In summary, results of the current study (1) tend to confirm an effect after administration of both tannin-rich resources (although stronger for sainfoin) on egg excretion and subsequent pasture contamination as a likely outcome; (2) demonstrate that significant effects were obtained in the sainfoin group on worm numbers particularly on *T. colubriformis* ($p < 0.05$). This might be explained by reduced L3 establishment in early parasitic stages; (3) reveal that the AH effects

were less consistent (and usually non-significant) with carob, potentially due to the limitations of its concentration in the ratio (high level of sugar but low proteins and lipids).

5. Conclusions

The importance of the use of local forages, plant parts or plant extracts in helminth control relies on their sustainable and environmental qualities [38]. Experience on the antiparasitic effect of *Ceratonia siliqua* remains rare. Due to the difficulties and the amount of variables that could interfere with pathophysiological, parasitological and body performance results, further investigations are needed to confirm the AH effects hypothesis and the type of secondary metabolites involved in the use of carob as a nutraceutical.

Acknowledgements. This study was supported by funding from Marie Curie Research Fellow (Healthy Hay Project) and COST-STSM-FA0805 – CAPARA – project. The authors also gratefully acknowledge funding from the European Community financial participation under the Seventh Framework Programme for Research, Technological Development and Demonstration Activities, for the Integrated Project LOWINPUTBREEDS FP7-CP-IP 222623. The views expressed in this publication are the sole responsibility of the author(s) and do not necessarily reflect the views of the European Commission. Neither the European Commission nor any person acting on behalf of the Commission is responsible for the use which might be made of the information contained herein.

References

1. Andlauer W, Fürst P. 2002. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, 35, 171–176.
2. Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology*, 99, 205–219.
3. Barrau E, Fabre N, Fouraste I, Hoste H. 2005. Effect of bioactive compounds from sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology*, 131, 531–538.
4. Brunet S, Aufrère J, El Babili F, Fouraste I, Hoste H. 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology*, 134, 1253–1262.
5. Brunet S, Hoste H. 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 7481–7487.
6. Brunet S, Jackson F, Hoste H. 2008. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *International Journal for Parasitology*, 38, 783–790.
7. Frutos P, Moreno-Gonzalo J, Hervas G, García U, Ferreira LM, Celaya R, Toral PG, Ortega-Mora LM, Ferre I, Osoro K. 2008. Is the anthelmintic effect of heather supplementation to grazing goats always accompanied by anti-nutritional effects? *Animal*, 2, 1449–1456.

ARTICLE 4: Supplementation of sheep with sainfoin hay or quebracho extract affects differently their population of adult *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*.

Authors

MARTÍNEZ-ORTÍZ-DE-MONTELLANO, C.^{a,b,c}, **ARROYO-LÓPEZ, C.^{a,b}**, AZANDO, E.V.^{a,b,d}, SANDOVAL-CASTRO, C.A.^c, TORRES-ACOSTA, J.F.J.^c, HOSTE, H.^{a,b}

^a INRA UMR 1225, F 31076 Toulouse Cedex, France.

^b Université de Toulouse ; ENVT; UMR 1225; F-31076 Toulouse, France.

^c Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán, México.

^d Université d'Abomey Calavi Bénin

In preparation

***Corresponding author:** Hoste, H. E-mail: h.hoste@envt.fr ,Tel: +33 561193875, Fax: +33 561193243

Abstract

The aim of this trial was to evaluate *in vivo*, the hypothesis of direct and/or indirect anthelmintic against gastrointestinal nematodes in lambs depending on the Tannin-Rich resources tested and the length of distribution. Thirty naïf Lacaune lambs were experimentally infected with 3000 (L3) of *H. contortus* (and 5000 (L3) of *T. colubriformis*. On D28 post-infection, animals were composed into three experimental groups: Control (C) received a tannin-free diet of Lucerne hay (*Medicago sativa*), Sainfoin (S) group, and *Onobrychis viciifolia* hay *ad libitum*. Finally, group (Q) was drenched with a suspension of Quebracho (*Schinopsis spp*) extract (5% DM). Half of the animals per group were exposed to a Short term treatment (7 days long) and the rest continued for Long term treatment (17 days long). Pathophysiological, parasitological and post mortem parameters were evaluated. Histological samples were also taken to measure mucosal inflammatory cell response. Total phenols, total tannins and condensed tannins content were also quantified. Results showed no differences for the effect of the length of distribution on BW gain and PCV values between groups, but a trend of decrease for PCV for Q on D42. A good correlation with FAMACHA and PCV values was found. No stat effects in the EPG and the inflammatory cell number was found affected by TR supplementation. Worm burden showed a significant reduction in both species due to the Q supplementation ($P<0.05$), specially for *T. colubriformis*. In terms of fertility, a reduction on *H. contortus* was seen ($P<0.05$) in S group, while the fertility of *T. colubriformis* was affected ($P<0.05$) for both resources. No strong evidences about the effect of length of distribution were observed.

DM (Dry Matter), BW (Body weight), PCV (Hematocrite values), EPG (Eggs per Gramm of Feaces), TR (Tannin Rich), GL (Globule leukocytes).

Keywords: Tannin-rich plants, gastrointestinal nematodes, *Onobrychis viciifolia*, Quebracho (*Schinopsis* sp), Length of distribution

1. Introduction

Bioactive or nutraceutical plants with anthelmintic (AH) properties are currently explored as an alternative to control parasites, in order to reduce the dependence on commercial AH drugs. The worldwide widespread of resistances to AH between populations of gastrointestinal nematodes (GINs) (Kaplan, 2004; Wolstenholme et al., 2004; Jackson et al., 2012), has stimulated the search of alternative approaches as secondary metabolites rich plants, particularly in Condensed Tannins (CTs) (Mueller-Harvey, 2006; Hoste et al., 2006). Nutraceutical plants have nutritional effects on host but also AH effectiveness (Hoste et al., 2011). Tannin- Rich plants are believed to be an excellent option for this purpose. Their anthelmintic efficacy is associated to a low to moderate concentration of CTs, whose benefits would affect host resilience and/or resistance (Hoste et al., 2006). The benefits of the intervention in the nutrition of hosts seems to be an interesting challenger, contributing to directly affect parasite and/or indirectly enhancing host welfare. These options are summarized in two non exclusive hypotheses: In the direct hypothesis, tannins are suspected to present a pharmacological-like effect by a direct interaction with the parasite (Hoste et al., 2011; 2012). On the other hand, the indirect hypothesis supposes that the AH effects are related to the improvement of host immune response, associated to the increase in the amount of peptides and amino acids, that reach the small intestine protected from ruminal degradation (Kahn and Diaz-Hernandez, 2000; Hoste et al., 2006). In general, two main effects have been reported, a decrease in the establishment of the infective third-stage larvae and or/a reduction in egg excretion (Heckendorn et al., 2006; Lange et al., 2006; Hoste et al., 2006; Shaik, et al., 2006; Heckendorn et al., 2007). Depending on studies, reduction in parasitic egg output has been related either to a reduced number of adult worms or to a decrease in the fertility of female worms (Paolini et al 2005a; Manolaraki et al., 2010). However, due to the great variety of experimental designs, type of tanniniferous resources tested, the length of AH treatment distribution, parasites and host species involved, it is difficult to assess the basis of these different effects. Considering Scharenberg et al., 2008, a long-term assay would improve the AH effects of TR plants, but also, polyphenols might be associated to detrimental effects in hosts (Muller Harvey, 2006). Host resistance to gastrointestinal nematodes is mainly mediated through acquired immunity, so an intervention on host nutrition might ameliorate the detrimental effects of the parasitic infection, by improving the resilience to parasitic infection (Coop and Kyriazakis, 1999, 2001; Houdijk and Athanasiadou, 2003; Kyriazakis and Houdijk, 2006; Sykes and Kyriazakis, 2007). In this paper, we pretend to measure *in vivo* the effect of tannin- rich resources in an artificial infection with *H. contortus* y *T. colubriformis* in lambs, after a short and long term exposure: a) to evaluate the direct effects on worms through pathophysiological, parasitological and post-mortem measures, b) to determine the indirect effects on host, assessing the level mucosal inflammatory cells (eosinophils, mast cells and globule leukocytes) in response to gastrointestinal infection, c) to check out the nature of tannin-resources tested and the role of length of distribution after a Short (7 days) and long term (17 days).

2. Materials and Methods

2.1. Localization

Trial was developed in France in the UMR/1225 INRA-DGER IHAP, École National Vétérinaire de Toulouse, from May to June 2009. Assays were performed according to local regulations of animal welfare.

2.2. Animals

Thirty naïf lambs, race Lacaune (*Ovis aries*), ± 2.5 months old, composed into three experimental groups (10 animals per group), depending on their feeding or AH treatment.

2.3. Source of tannins

Two tanniniferous resources were offered, the Sainfoin hay (*Onobrychis viciifolia*) and the commercial powder Quebracho (*Schinopsis* sp), as a source of condensed tannins. The free-tannin forage Lucerne (*Medicago sativa*) was tested as positive Control.

2.4. Parasites

A mixture of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* at infective larvae stage (L3) orally administrated. Larvae were obtained from donor goats experimentally infected with a pure strain of each nematode species, from the UMR 1225 INRA-DGER IHAP, École National Vétérinaire de Toulouse (France).

2.5. Experimental design

Plant analyses

Total phenols (TPs) and Total Tannins (TTs) content in Quebracho, Sainfoin and Lucerne extracts were determined by the Folin-Ciocalteu method. A Vanillin-HCl method was used for the evaluation of Condensed Tannins (CTs) content. Sainfoin and Lucerne hay extracts were obtained following the procedure with acetone-water (70:30) and dichloromethane describe by Makkar, 2003.

In vivo Assay

On day 0 (D0), thirty naïve lambs race Lacaune were experimentally infected with mixture of third-stage larvae of *Haemonchus contortus* (3000 (L3)) and *Trichostrongylus colubriformis* (5000 (L3)). Animals were offered high quality gramineous Lucerne hay and commercial concentrate. On day 28 post-infection, animals were composed into three experimental groups (10 lambs per group) well balanced according to sex, bodyweight and the level of egg excretion. Control group (C) continued with the tannin-free diet of Lucerne hay (*Medicago sativa*), Sainfoin group (S) received *Onobrychis viciifolia* hay *ad libitum*. Finally, the Quebracho group (Q), received a suspension of Quebracho extract representing the 5% of daily Dry Matter. All the feed regimes were isoenergetic and isoproteic, well balanced also for crude fiber, Ca and P. On D36, the half of the lots were humanely slaughtered representing the Short term treatment groups (8 days long) (SS, QS, CS), the rest of the animals continued for a Long term treatment (17 days long) (SL, QL, CL). On D45 post-infection the rest of the animals were also slaughtered. Immediately after death, the abomasums and small intestines were removed and gently washed to collect luminal contents. Moreover, a pepsin digestion was performed to collect the hypobiotic.

According to ethical reasons the selection of animals for the first euthanasia, relied on the individual physiological status based on hematocrite values.

Measurements

Individual measurements which characterized either host resilience (pathophysiological measurements) or host resistance (parasitological measurements) were individually recorded, as well as post-mortem measurement. Histological samples from fundus, pylorus and small intestine were also collected for pro inflammatory cells counts.

Pathophysiological measures

Body weight (BW) was fortnightly recorded from D0. Individual blood samples were also taken fortnightly from D-6 (before infection) to D42. Blood was taken by venipuncture of the jugular vein and collected in heparin tubes to measure packed cell volume (PCV), following the Microhaematocrit method (Hansen and Perry, 1994). A FAMACHA Test was also periodically recorded.

Parasitological measures

Individual fecal samples were taken directly from the rectum. Fecal egg counts (FECs) expressed as eggs per gram of faeces (EPGs) were determinate according to a modified McMaster technique (Raynaud, 1970). After the initial evaluation the coprological analysis were weekly developed till D23 post infection, then samples were taken every 2 weeks. Moreover, percentage of egg reduction (PER) was determinate according to (Wood et al., 1995). In addition, coprocultures per group of treatment were also performed following the Baermann's method to obtain a L3 mixture of species solution, kept at 4°C. Larvae (L3) harvested from each culture were identified according to the keys described in Wood et al., 1995.

Post mortem measures

Total adult worm burden and fertility of worms recovered from the abomasum and small intestine were established (Hansen and Perry, 1994). After slaughtered, abomasum and small intestine were immediately removed and gently washed to collect the luminal content and worm burden. Abomasal mucosa was digested using a pepsin digestion, after 4-hour of incubation in a pepsin solution at 37°C, to obtain the hypobiotic larvae (Wood et al., 1995). Worm counts were performed according to a 10% aliquot technique. Worm stages, sex ratio and species were also considered (MAFF, 1986). Fertility of females was evaluated from 20 females collected per lamb and target organ. For *H. contortus*, worms were independently dehydrated in ethanol 70%, then hydrated in distilled water and crushed to release eggs from the uterus. For *T. colubriformis*, fertility was estimated by directly counting eggs in uterus after cleared with lactophenol, under microscope (Kloostermann et al., 1978).

Histological analyses

At the necropsy, histological samples were collected from fundus, pylorus and small intestine for further quantification of mast cells, globule leukocytes and eosinophils according to the technique described by Larsen et al., 1994 and Huntely et al., 1995. Samples were fixed either in 10% buffered formaldehyde solution or Carnoy's solution. The mast cells were counted after staining with Alcian-blue-safranin on the Carnoy's fixed samples. Tissues fixed in formaldehyde were stained with hematoxylin-eosin to count globule leukocytes and eosinophils. The stained cells were enumerated at a 400 magnification using a

calibrated reticule encompassing an area of 0.25mm². Mean cell densities per tissue and per cellular types were obtained from the mean counts on 10 fields, randomly selected. The results are expressed as the mean number of cells per mm² of mucosa according to Paolini et al., 2003b.

2.6. Statistical analysis

Before statistical analysis FECs, worm burden and fertility of female data were log₁₀ (X+1) transformed. The statistical comparisons for BW, FECs and PCV were performed by use of either analysis of variance on repeated measures, in addition to a data by data one way analysis of variance (ANOVA), completed by *post hoc* Bonferroni test. Differences on mean number worm burden and fertility of each species were examined with the non- parametric Kruskal Wallis test. Finally a data by data Spearman correlation between PCV values and *H. contortus* population was carried out. Worm burden and the fertility of females per species were compared using respective two-factor ANOVA test, considering treatment or diet as one of the factor and the length of distribution the second factor involved, completed by a *post-hoc* Bonferroni test. Finally, mean values of mucosal cell counts (EOS, GL and MC) were compared using similar two-way analysis of variance with a *post-hoc* Bonferroni test. All statistical analyses were performed using the SYSTAT 9.0 software.

3. Results

Plant analyses

The polyphenol content in extracts after the Folin-Ciocalteu method and the Vanillin-HCl assay, revealed an amount of TPs: 1.08, TTs: 0.26 and CTs: 0.22 for Sainfoin extract and TPs: 8.82, TTs: 4.96 and CTs: 7.07 for Quebracho powder. TPs, TTs are expressed as g-equivalent of tannic acid/100g Dry Plant (DP) and CTs, expressed as g-equivalent of catechin/100g DP.

Pathophysiological measurements

Body weight: On D6, the mean body weight (BW) of lambs was 15 ± 2.86kg. On D35, the mean BW for short term groups (CS, SS, QS) was 21 ± 2.44 kg, while on D42 the mean BW for long term treatment (CL, SL, QL) was 26 ± 4.95 kg at slaughter. No statistical differences were found in the increase of bodyweight between groups, neither for Short and Long Term treatments.

PCV: Prior to experimental period, PCV values did not show any statistical difference between lambs. No significant differences were found from D28 between groups neither considering treatment nor length of tannin source distribution. Results on D42 were closed to significance (P < 0.10) in contrast to control group.

FAMACHA: Results showed a progressive increase in the FAMACHA score through the trial. From D(-6) to D0 the colors of the eyelid were within normal parameters, score: 1, but getting paler from D0 till D28, scores 2-3. The Spearman correlation of FAMACHA© and PCV values showed a significant correlation 1-2% for the Short Term period D7 and D35 and a 5% of correlation on D42 corresponding to the Long Term treatment.

Parasitological measurements

Fecal egg counts: No stat effects for EPG between groups were detected. On D44 results were closed to significant ($P<0.12$) for Sainfoin group in a long term treatment (Fig.1). A 67.21% percentage of reduction in egg excretion was noticed, on D44 for those lambs feed with Sainfoin.

Coproculture: From 85 to 96% of the infective-stage larvae identified from coprocultures were *H. contortus*, the rest till 100% were *T. colubriformis*.

Post mortem measures

Adult Worm burden: According to the treatment factor, worm number was significantly lower for both *H. contortus* and *T. colubriformis* in lambs receiving the Q extracts ($P<0.01$). Percentages of reduction for Quebracho were 18.8% and 36.4% in case of *H. contortus*, 18.8% and 25.7% for *T. colubriformis*, corresponding to short and long term treatments respectively. No significant differences were when analyzing the effect of length of distribution.

Worm fecundity: Significant statistical differences were found for fertility of both *H. contortus* and *T. colubriformis* between groups. For *H. contortus*, fertility was statistical significant lower ($P<0.01$) in the group S, compared to Q and C groups. In case of *T. colubriformis*, lower fertility was found in the Q and S ($P<0.05$) group when compared to the C group (Table 1). In contrast, No stat effects were found for the length of distribution.

Histological analyses

Independently of the location of the tissues, fundus, pylorus or small intestine no significant differences were found between the three experimental groups for the mast cell number. Significant differences were found for eosinophils in the pylorus ($P<0.05$), with higher values in the S group compared to the Q and C groups. The most consistent statistical differences were found for the mucosal GL numbers. Significant differences according to the treatment were found for the fundic ($P<0.01$) and the intestinal ($P<0.01$) Globule leukocytes values. Lower values were found in the C group compared to the S and particularly the Q group. However, no significant differences were found between the groups for the number of GL in the pylorus (Table 2).

4. Discussion

The main objectives of this trial were to measure the direct and or indirect effects of two different sources of tannins, depending on the length of distribution, in order to help us to better understand the AH effectiveness in resilience or resistance of hosts against GINs (Hoste et al., 2006). Until now, most of the assays have been focused in GINs' larval stages in small ruminants, for this reason we designed a trial to elucidate these effects on the gastrointestinal adult worm population. We pretended to measure the pathophysiological effects in hosts, but also the parasitological and post- mortem parameters. To increase the consistence of our data, histological samples were also taken to measure the cellular infiltration. Considering the pathophysiological data obtained, we did not found evidences of an increase in the Body Gain rate associated to tannin-rich resources consume or to the time of exposure. Since the beginning, a progressive decrease on the PCV levels was observed, associated to the loss of blood and plasmatic proteins caused by *H. contortus* infection, as hematophagous GIN (Parkins and Holmes 1989; Holmes 1993). After the first necropsy (D35), an increase in the PCV values was noticed, but we cannot

associate it to an effect of the length of distribution. This fact seems to be much more associated to the effect of the animal selection. For ethical reasons, lambs with lower PVCs values were selected to be in the Short term group. This decision could have an important effect in the statistic. Even though, a trend on D42 post-infection for Quebracho, corresponding to the long term treatment, was observed. To complete the hematocrite values, a FAMACHA test was also performed. Our aim was to check out if this semi-quantitative method is a good system to reflect the degree of anemia. A good correlation was found between FAMACHA results and the percentages of erythrocytes measured on D42. Then, we can also affirm that FAMACHA test seems to be an interesting system to evaluate the degree of anemia for the “blood sucker” *H. contortus*. In terms of parasitological measures, a clear reduction in worm burden for both species (*H. contortus* and *T. colubriformis*) especially for *T. colubriformis*, in lambs supplemented with Quebracho extract (QS and QL), was measured. Similar results were previously reported in sheep (Athanasiadou, et al., 2000ab) and goats (Paolini et al., 2003a), contrarily to other authors who only reported this effects in case of the abomasal worms (Max et al., 2005) in sheep. A reduction in the fertility of *T. colubriformis* fertility but not in *H. contortus* was also assessed for Q. Meanwhile, Sainfoin did not affect worm burden, but a reduction in the fecundity of female both species of worms occurred. These results suggest that differences might be associated to: the mode of action of the source of tannins, other secondary metabolites possible involved, but also due to particularities of each worm species (Paolini, et al., 2005b; Athanasiadou et al. 2007): as nutrition (Linklater and Smith, 1993; Hansen and Perry, 1994) and the own chemical characteristics of the nematode’s cuticle (Fetterer and Rhoads, 1993; Page, 2001). In the present assay Quebracho extract was chosen as a good condensed tannins commercial source, but the dosage during the trial, was not adjusted to the rate of growth of the experimental lambs. So a progressive readjustment of Quebracho dosage to each individual live weight rate might arise a better AH effectiveness results. Contrary to Quebracho, the administration of Sainfoin was *ad libitum*, implying that hosts would have consumed the amount of Sainfoin depending on their progressive increase of live weight and needs through the time. After the polyphenol content evaluation of Sainfoin hay, we verified a low concentration of TPs, TTs and CTs. The values obtained with the Folin-Ciocalteu and Vanillin-HCl methods, showed that Total Phenols content in Sainfoin represented the 12% of those found in Quebracho extract. The same situation was also observed for Total Tannins (5.24%) and Condensed Tannins content (3.12%). These low levels are probably associated to the particular Sainfoin strain used within this trial, composed of a low polyphenol concentration or grown in particular geographic region, where Sainfoin do not produce large amounts of polyphenols (Manolaraki et al., 2010). Even though, the mode of action of tannins or Bioactivity (Hoste et al., 2010; Alonso-Díaz et al., 2010ab; Hoste et al., 2012) has not yet been elucidated, this might complete all the information. Based in previous reports where TRPs or resources were associated to the modulation of GINs, we evaluated the effect on the egg excretion. No consistent findings were measured within this trial, only in case of Sainfoin, effect assumed after the estimation of the percentages of reduction (67.21%), in contrast to Control values. These results might be associated to the effect of CTs in egg excretion (Coop and Kyriazakis, 1999; Niezen et al., 2002; Tzamaloukas, et al., 2005; Paolini et al., 2005b; Heckendorn et al., 2006) and the decrease of the female fertility observed in goats and sheep, contributing to the decrease

of pasture contamination and to the modulation of the epidemiology of *Trichostrongylus*. The evaluation of worm burden, confirmed a decrease of *T. colubriformis* and *H. contortus* adult worms, coinciding with previous reports with lambs treated with Quebracho extract (Mangan, 1988; Athanasiadou et al., 2000b, Coop et al., 2001). In the other hand, we cannot confirm the effect of Sainfoin hay to worm burden, but it seems to decrease the fertility per capita for *H. contortus* (Paolini et al., 2005a) and *T. colubriformis*. In case of Quebracho, this extract was associated to the reduction of per capita fertility of *T. colubriformis*, confirming the higher susceptibility of intestinal species respect to abomasal ones (Athanasiadou et al., 2000a). In terms of length of distribution, our results did not confirm the existence of differences between a Short and Long term treatment, neither for worm burden nor for the fertility of females. In summary, the results obtained after our in vivo experience seems to confirm the AH effectiveness of tannin rich plants or resources in the decrease of EPG, the fertility of females as well, as the immune response of host to worm. It also seems to confirm the participation of Sainfoin in the modulation of trichostrongylos infestations. The present experimental design failed to prove any long term effect of tannins on the inflammatory response of lambs. It could be necessary to test longer periods of tannin supplementation compared to controls to accept or discard any possible effect of tannins on the immune response. The differences found on the concentration of tannins would explain the differences in the results obtained *in vitro* (Paolini et al., 2004) and *in vivo* (Paolini et al., 2003b; Paolini et al., 2005b), allowing us to confirm the hypothesis of a direct relationship of tannin-dosage administration and time of exposure in the effects against GINs population. A posteriori analysis of serum samples will allow as to test the hypothesis of indirect effect on worms after a Rich tannin diet (Coop and Kyriazakis, 1999) due to the protection of protein against ruminal degradation (Mangan, 1988; Athanasiadou et al., 2000b; Coop and Kyriazakis, 2001).

5. Conclusions

Sainfoin hay (*Onobrychis viciifolia*), contributes to the modulation of *Trichostrongylus*. No effects of Sainfoin on adult worm burden decrease, but there are evidences of effects on fertility for both species *T. colubriformis* and *H. contortus*. The cellular response of the hosts changed when supplemented with tannin rich materials, globule leucocytes increased was more evident in those animals exposed to worms for longer time, including the control animals Eosinophils were higher in pylorus of Sainfoin treated animals. Thus, the present experimental design failed to prove any long term it could be necessary to test longer periods of tannin supplementation compared to controls to accept or discard any possible effect.

Acknowledgments

C. Martínez-Ortiz de Montellano wishes to acknowledge a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) to undergo her PhD studies. The financial help of the Marie Curie Program «Healthy Hay» project as well as of an ECOS-Nord project between France and Mexico is sincerely thanked. Special thanks to Fotini Manolaraki, Mme. Celine and Mme. Isabelle Pardo for their technical assistance and their useful advices during the experiment.

7. REFERENCES

- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Capetillo-Leal, C., 2010a. Polyphenolic compounds of nutraceutical trees and the variability of their biological activity measured by two methods. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 12, 649-656.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., 2010b. Tannins in tropical tree fodders to small ruminants: A friendly foe? *Small Rumin. Res.* 89,164-173.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2000a, Effects of short-term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis* *Veterinary Record* 146, 728-732.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2000b, Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasitised with *Trichostrongylus colubriformis* *International Journal for Parasitology* 30, 1025-1033.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2001a. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Vet. Parasitol.* 99, 205-219.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F. Coop, R.L., 2001b. The effects of condensed tannins supplementation of foods with different protein content on parasitism, food intake and performance of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Br. J. Nutr.* 86, 697-706.
- Athanasiadou, S., Githiori, J., Kyriazakis, I., 2007. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Anim.* 1, 1392-1400.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Giannenas, I., Papachristou, T.G., 2009. Nutritional consequences on the outcome of parasitic challenges on small ruminants. *Options Méditerranéennes.* 85, 29-40.
- Brunet, S., Fourquaux, I., Hoste, H., 2011, Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitology International* 60, 419-424.
- Coop, R.L., Kyriazakis, I., 1999, Nutrition-parasite interaction. *Vet. Parasitol.* 84, 187-204.
- Coop, R.L., Kyriazakis, I., 2001, Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends Parasit.* 17, 325-330.
- Fetterer, R.H., Rhoads, M.L., 1993. Biochemistry of the nematodes cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. *Vet. Parasitol.* 46, 103-111.
- Hagerman, A.E., 1992. Tannin protein interactions. In: Ho, Le and Huang (Eds.), *Phenolic compounds in food and their effects on health: Analysis, occurrence and chemistry*, American chemical society, Washington DC, pp. 236-247.
- Hansen, J., Perry, B., 1994. The Epidemiology, Diagnosis and Control of Helminth Parasites of Ruminants. ILRAD, Nairobi, pp. 17–25, 66–83, 131–132.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W., Hertzberg, H., 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Vet. Parasitol.* 142, 293-300.

- Heckendorn, F., Haring, D.A., Maurer, V., Senn, M., Hertzberg, H., 2007. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Vet. Parasitol.* 146, 123-134.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 22, 253-261.
- Hoste, H., Martínez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Vet. Parasitol.* 186, 18-27.
- Huntley, J.F., Patterson, M., Mackellar, A., Jackson, F., Stevenson, L.M., Coop, R.L., 1995. A comparison of the mast cell and eosinophil responses of sheep and goats to gastrointestinal nematode infections. *Res Vet Sci* 58, 5-10.
- Kahn, L.P., Diaz-Hernandez, A., 2000. Tannins with anthelmintic properties. In: Brooker, J.D. (Ed.), *Tannins in livestock and Human Nutrition*. ACIAR Proceedings n. 92 International workshop, Adelaide, Australia, pp. 140-149.
- Larsen, M., Anderson, D.H., Vizard, A., Anderson, G.A., Hoste, H., 1994. Diarrhoea in Merino ewes during winter: association with trichostrongylid larvae. *Aust. Vet. J.* 71, 365-372.
- Lange, K.C., Olcott, D.D., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Terrill, T.H., Burke, J.M., Kearney, M.T., 2006. Effect of sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lambs. *Vet. Parasitol.* 141, 273-278.
- Linklater, K., Smith, M.C., 1993. *Diseases and disorders of the sheep and goat*. Mosby-Wolfe. London, UK. pp. 45-46.
- MAFF (MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD). 1986. Helminthology. In: *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*, Reference Book 418, 3rd edn. Her Majesty's stationery office, London. UK.
- Mangan, J.L., 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition Research Review* 1, 209–231.
- Makkar, H.P.S. 2003. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. A Laboratory Manual. Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy Agency (FAO/IAEA), Vienna, Austria pp, 49–53.
- Manolaraki, F., Sotiraki, S., Stefanakis, A., Skampardonis, V., Volanis, M., Hoste, H., 2010. Anthelmintic activity of some mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology.* 137, 684-696.
- Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Vargas-Magaña, J.J., Aguilar-Caballero, C.A., Sandoval- Castro, C.A., Cob-Galera, L., May-Martínez, M., Miranda-Soberanis, R., Hoste, H., Cámara- Sarmiento, R., Torres-Acosta, J.F.J., 2007. Combining the effects of supplementary feeding and copper oxide needles for the control of gastrointestinal nematodes in browsing goats. *Vet. Parasitol.* 146, 66-76.
- Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Arroyo-López, C., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., 2013. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under in vivo and in vitro conditions. *Experimental Parasitology* 133, 281-286.

- Max, R.A., Wakelin, D., Dawson, J.M., Kimambo, A.E., Kassuku, A.A., Mtenga, A., Craigon, J., Buttery, P.J., 2005. Effect of quebracho tannin on faecal egg counts and worm burdens of temperate sheep with challenge nematode infections. *J. Agric. Sci.* 143,519-527
- Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 86, 2010-2037.
- Niezen, J.H., Waghorn, G.C., Graham, T., Carter, J.L., Leathwick, D.M., 2002, The effect of diet fed to lambs on subsequent development of *Trichostrongylus colubriformis* larvae in vitro and on pasture. *Veterinary Parasitology* 105, 269-283.
- Page AP., 2001. The nematode cuticle: synthesis, modification and mutants. In: Kennedy MW, Harnett W, editors. *Parasitic Nematodes: Molecular Biology, Biochemistry and Immunology*, London: CABI publishing. pp. 167-193.
- Paolini, V., Dorchies, P., Hoste, H., 2003a. Effects of sainfoin hay on gastrointestinal nematode infections in goats. *Vet. Rec.* 152, 600-601.
- Paolini, V., Bergeaud, J.P., Grisez, C., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2003b, Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 113, 253-261.
- Paolini, V., De La Farge., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2005a. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 127, 277-283.
- Paolini, V., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2005b, Lack of effects of quebracho and sainfoin hay on incoming third-stage larvae of *Haemonchus contortus* in goats. *Vet. J.* 170, 260-263.
- Price, M.L., Van Scoyoc, S., Buttler, L.G., 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 26, 1214.
- Raynaud, J.P., 1970. Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 45, 321-342.
- Scharenberg, A., Heckendorn, F., Arrigo, Y., Hertzberg, H., Gutzwiller, A., Hess, H.D., Kreuzer, M., Dohme, F., 2008, Nitrogen and mineral balance of lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and fed tanniferous sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *J. Anim. Sci.* 86, 1879-1890.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Kaplan, R.M., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2006, *Sericea lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Vet. Parasitol.* 139, 150-157.
- Steppek, G., Behnke, J.M., Buttle, D.J., Duce, I.R., 2004. Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? *Trends Parasitol.* 20, 322-327.
- Tzamaloukas, O., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., R.L., C., 2005, The consequences of short-term grazing of bioactive forages on established adult and incoming larvae populations of *Teladorsagia circumcincta* in lambs. *Int. J. Parasitol.* 35, 329-335.

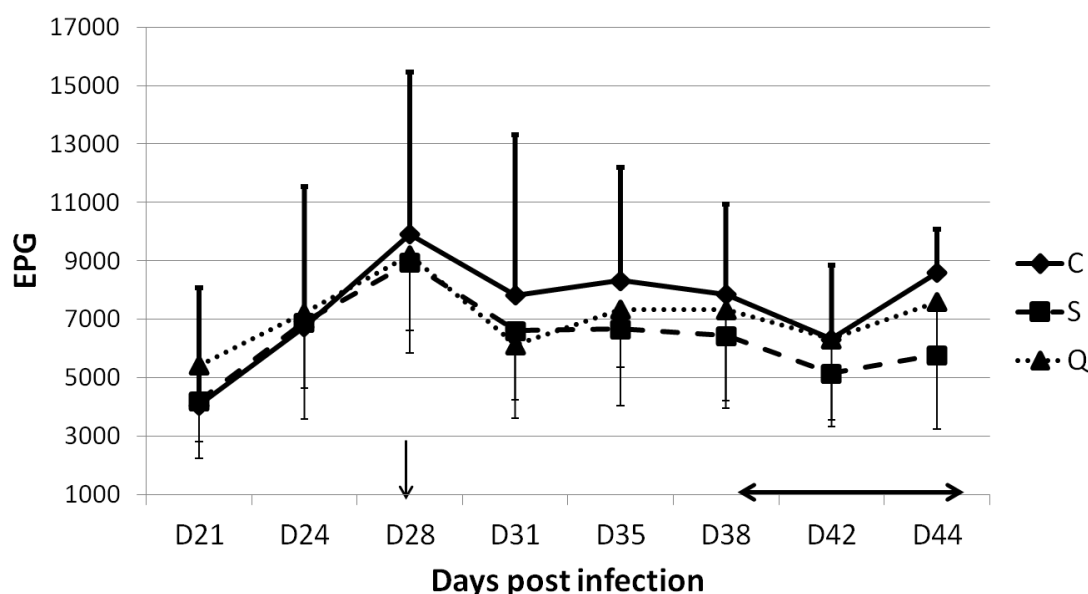


Figure 1. Arithmetic mean of faecal egg counts (Eggs per gram of faeces) in lambs fed with Sainfoin (S), lambs treated with Quebracho extracts (Q) and Control group of lambs fed with a tannin free-diet. Vertical arrow represents the start of the diets. Horizontal arrow represents the length of distribution.

		Mean worm number			Fecundity (eggs in utero)		
Groups		FEC	Total worm number	<i>Haemonchus contortus</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	<i>H. contortus</i>	<i>T. colubriformis</i>
Control	Short	9262	4318 (± 1002.41)a	1424 (± 269.69)a	2894 (± 772.77)a	513.9 (± 232.22)b	26.6 (± 5.26)b
Term CS		(± 6170.72)					
Mean (\pm S.D.)							
Control	Long	6275 (± 2571.02)	3618 (± 679.25)a	1212 (± 522.42)a	2406 (± 841.56)a	619.7 (± 336.21)b	27.31 (± 4.89)b
Term CL							
Mean (\pm S.D.)							
Sainfoin	Short	7668 (± 2576.90)	5508 (± 577.94)ab	1472 (± 154.98)ab	4036 (± 961.73)ab	374.2 (± 225.63)a	24.29 (± 5.22)ab
Term SS							
Mean (\pm S.D.)							
Sainfoin	Long	5709 (± 2333.97)	4490 (± 294.01)ab	1326 (± 295.54)ab	3018 (± 484.69)ab	317.5 (± 176.85)a	25.23 (± 4.19)ab
Term SL							
Mean (\pm S.D.)							
Quebracho	Short	7664 (± 2905.04)	3506 (± 722.07)ac	1156 (± 542.15)ac	2350 (± 1364.83)ac	581.2 (± 306.58)b	24.66 (± 4.84)a
Term QS							
Mean (\pm S.D.)							
Quebracho	Long	6688.75 (± 2883.83)	2560 (± 933.90)ac	774 (± 258.9)ac	1786 (± 1412.63)ac	802.0 (± 295.31)b	23.95 (± 4.51)a
Term QL							
Mean (\pm S.D.)							

Table 1. Arithmetic means (\pm S.D.) of the transformed FEC, mean worm counts (total worm burden and per worm species), fertility of female of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in the treatment groups. CS: Control Short term, CL; Control Long term, SS: Sainfoin Short term, SL Sainfoin Long term, QS Quebracho Short term, QL Quebracho Long term.

ANEXO: ARTÍCULOS DE DISEMINACIÓN
ANNEX: DISSEMINATION PAPERS

ARTICLE 5: Strongyloses: Nouvelles approches: Parasitisme helminthique des ruminants: le paradoxe du pâturage?

Authors

HOSTE, H.^{*,**}, **ARROYO LOPEZ, C.** ^{*,**,***} MANOLARAKI, F. ^{*,**}, OJEDA ROBERTOS, N. ^{*,**,***}, SOTIRAKI, S. ^{*,**,***}, TORRES ACOSTA, J.F.J.^{*,**,***}.

* Inra, UMR 1225 Interactions hôte-agents pathogènes,

** Université de Toulouse, ENVT, UMR 1225 23, chemin des Capelles, 31076 Toulouse

*** Nagref-VRI, Nagref Campus, Thermi 57001 PO Box 60272 Thessaloniki, Grèce

**** Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán, Mexique.

Le Point Vétérinaire/Parasitologie interne des ruminants, 11, 30–35, (2012).

Parasitisme helminthique des ruminants : le paradoxe du pâturage ?

Hervé Hoste^{*,**},
Célia Arroyo Lopez^{*,**,*},
Fotini Manolaraki^{*,**},
Nadia Ojeda Robertos^{*,****},
Smaragda Sotiraki^{*,****},
Juan Felipe de Jesús Torres Acosta^{*,****}

* Inra, UMR 1225 Interactions hôte-agents pathogènes,
** Université de Toulouse, ENVT, UMR 1225
23, chemin des Capelles, 31076 Toulouse
*** Nagref-VRI, Nagref Campus, Thérmi 57001
PO Box 60272 Thessaloniki, Grèce
**** Facultad de medicina veterinaria y zootecnia,
Universidad autonoma de Yucatán, Km 15.5 carretera
Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán, Mexique

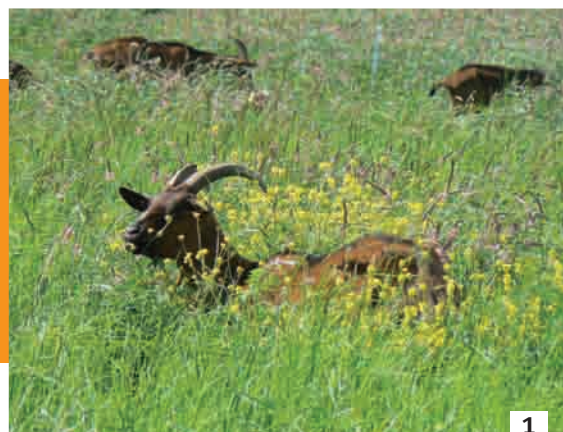
0,05 CFC
par article lu

Résumé

► Les interactions entre alimentation des ruminants domestiques au pâturage et parasitisme helminthique sont multiples. Le pâturage est la source d'infestation des

animaux. Toutefois, les ressources nutritionnelles peuvent aussi avoir des effets favorables sur le parasitisme. En prenant l'exemple des strongyloses gastro-intestinales, cette revue présente ces interactions

nutrition-parasitisme sous l'angle qualitatif et quantitatif, puis évoque comment le comportement alimentaire des ruminants constitue un déterminant essentiel dans ces interactions.



1. Les ruminants seraient-ils des “pharmacologistes à quatre pattes”, capables d'exploiter la diversité botanique ?

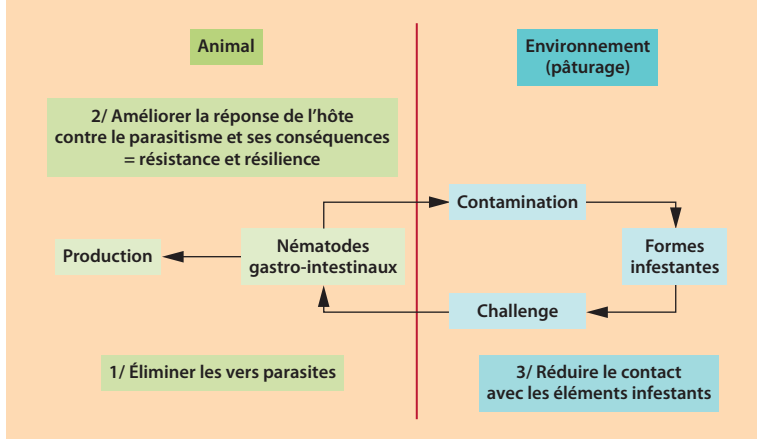
PHOTO : X. NOULHIANNE

Les demandes actuelles des consommateurs en faveur d'une agriculture durable visent à réduire l'emploi des intrants chimiques en agriculture, à promouvoir la biodiversité et le bien-être animal, donc à promouvoir l'image des ruminants à l'herbe. Ces attentes se traduisent dans les cahiers des charges correspondant à des modes de production spécifiques (par exemple, l'agriculture biologique) ou à des chartes de qualité des produits. Le pâturage reste ainsi une ressource nutritionnelle centrale pour les ruminants, comme fourrages exploités directement ou pour fournir des stocks distribués sous forme conservée. Toutefois, en terme sanitaire, le pâturage est aussi source de risques parasitaires plus élevés, notamment par une exposition accrue aux éléments infestants d'helminthes. L'exemple le plus flagrant des limites d'une gestion quasi exclusive de ce risque parasitaire, reposant sur des molécules anthelminthiques (AH) de synthèse est illustré par le cas des résistances aux AH chez les strongyloses gastro-intestinales (SGI) des petits ruminants, mais l'augmentation inquiétante de prévalences de ces résistances chez

les bovins en Amérique du Sud est un signe d'alerte [18]. Ces faits soulignent le besoin d'intégrer des modes de lutte complémentaires pour gérer ces parasitoses au long terme et restreindre au mieux leurs conséquences économiques. Le paradoxe du pâturage est qu'il représente à la fois une ressource majeure et un risque sanitaire accru. De plus, les interactions entre nutrition et parasitisme par des helminthes sont complexes. Par de multiples aspects, la nutrition des ruminants représente un levier non négligeable pour aider les herbivores à combattre le parasitisme, en interférant à des moments clés du cycle biologique des vers ou à mieux en supporter les conséquences physiopathologiques (photo). L'objectif de cet article est de présenter l'état actuel des connaissances sur les interactions entre nutrition des

FIGURE 1

Les trois modes d'interactions possibles entre nutrition et étapes clés du cycle des strongles gastro-intestinaux



ruminants et infestations par des helminthes. Ces connaissances pourraient aboutir à des solutions complémentaires (voire alternatives) pour réduire l'emploi des AH de synthèse. La plupart des exemples cités portent sur les SGI des petits ruminants, en raison :

- de l'importance des résistances aux AH de synthèse chez les ovins et les caprins à l'échelle mondiale ;
- de la gravité de certaines situations d'élevage où aucun AH de synthèse ne peut désormais être recommandé, en se fondant sur des critères d'efficacité ou de respect des réglementations ;

Les différents points d'impact de facteurs nutritionnels sont illustrés en fonction des trois principes de lutte contre tout agent pathogène : traiter, favoriser la réponse de l'hôte et réduire la contamination du milieu et les contacts entre l'hôte et les sources d'infestations (figure 1).

DES ALIMENTS POUR TRAITER

► Les premières molécules AH chimiques de synthèse datent des années 1950 et les premiers cas de résistances objectivés du début des années 1960 [40]. Auparavant, pendant des siècles, dans de multiples civilisations, l'exploitation de substances naturelles, principalement issues de plantes, a été le socle de la pharmacopée pour lutter contre des helminthoses d'importance médicale ou vétérinaire.

► Le recours à des remèdes de phytothérapie a des objectifs proches des AH de synthèse. Les traitements reposent sur des préparations de plantes qui ne sont généralement pas des constituants habituels de l'alimentation des ruminants. À l'instar des AH de synthèse, leur administration est forcée, ponctuelle, sur des durées courtes, et l'objectif est d'éliminer les vers et de "casser" ainsi le cycle biologique.

► Depuis près de 20 ans, le concept de nutriment a commencé à être exploré en élevage. Par définition, il s'agit d'aliments initialement exploités pour nourrir les

animaux qui se révèlent dotés de propriétés favorables pour la santé [1]. Le mode d'exploitation envisagé ne repose pas sur l'idée d'une administration ponctuelle, individualisée d'extraits, comme pour les remèdes de phytothérapie, mais au contraire suppose une distribution de ressources fourragères offertes aux animaux sur des périodes de plusieurs jours. L'objectif est davantage préventif, en modifiant la biologie des vers, que curatif.

► L'exemple le plus largement étudié dans le cas des SGI des ruminants concerne les propriétés antiparasitaires de légumineuses fourragères (*Fabaceae*) riches en tannins condensés. Si les tannins ont longtemps été considérés en zootechnie comme des composés néfastes, donc à éviter, des données plus récentes soulignent leur intérêt sur les plans zootechnique, sanitaire ou environnemental [34]. Selon les objectifs d'élevage, ces résultats viennent fortement nuancer une perception initiale très négative. Ils incitent à mieux comprendre les relations entre l'animal parasité et son environnement, souvent riche en substances tanniques.

1. Effets anthelminthiques de légumineuses riches en tannins condensés

► Les premières études sur l'utilisation de plantes riches en tannins comme moyen de lutte contre les SGI ont été conduites en Nouvelle-Zélande chez des agneaux infestés naturellement [29, 30]. Les résultats montrent que la consommation de légumineuses riches en tannins condensés (TC) comme le sulla (*Hedysarum coronarium*) ou les lotiers pédonculé et corniculé (*Lotus pedunculatus* et *Lotus corniculatus*) est associée à des excréments fécaux d'œufs de nématodes ou à des populations de vers significativement réduites par comparaison aux agneaux pâturant des plantes sans TC, comme la luzerne (*Medicago sativa*), le plantain (*Plantago lanceolata*), ou un mélange ray gras/trèfle (*Lolium perenne*/*Trifolium repens*).

► Ces premières données ont ensuite été confirmées de manière répétée par des travaux portant :

- chez d'autres hôtes que les ovins (caprins ou cervidés). De plus, des résultats *in vitro* récents suggèrent un effet probable sur les principaux nématodes des bovins [31] ;

Points forts

→ Le paradoxe du pâturage constitue à la fois une ressource nutritionnelle essentielle et un risque parasitaire (helminthique) majeur.

→ Les interactions nutrition-parasitisme chez les ruminants au pâturage sont complexes.

→ Ces interactions dépendent du comportement alimentaire et influent sur la réponse immunitaire de l'animal.

→ Des données récentes suggèrent que, même chez les ruminants, l'aliment pourrait aussi servir d'aliment.

→ En pratique, le vieux adage « Nourrissez bien vos animaux, ils s'occuperont des parasites » reste d'actualité.

ENCADRÉ 1

Les diverses formes d'exploitation des légumineuses riches en tannins

► L'utilisation "en vert" des légumineuses riches en tannins par consommation directe sur les parcelles a été la première approche examinée [29, 30]. Elle rencontre toutefois plusieurs contraintes : décalage possible entre la présence des vers et la disponibilité des ressources, moindre résistance au piétinement, difficulté de mesurer les composés actifs sur une plante en pied.

► L'emploi de formes conservées (foin ou ensilage) s'est révélé probant par des distributions à

l'auge de 10 à 15 jours le matin avant mise au pâturage [11, 12, 32].

► L'emploi de ces formes en stock permet de mieux adapter les périodes de distribution et aussi de mesurer les quantités de tannins et les propriétés antiparasitaires avant exploitation. Enfin, des filières visant à produire des bouchons déshydratés à partir de légumineuses riches en tannins (comme le sainfoin) se développent [10]. Les premiers résultats sont encourageants [35].

- sur d'autres légumineuses riches en TC, qu'elles soient d'origine tempérée (par exemple, le sainfoin [*Onobrychis viciifoliae*]), subtropicale (*Sericea lespedeza*, *Lespedeza cuneata*), ou tropicale (*Lysiloma latissiliquum*) [14, 34] ou exploitées sous diverses formes : en vert, foin, ensilage ou bouchons déshydratés (encadré 1).

► Pour résumer les principaux résultats avec ces diverses ressources, deux effets principaux ont été associés à la consommation de plantes riches en TC :

- un effet sur la contamination du milieu extérieur ;
- un effet sur le succès d'installation des larves de stade 3

(encadré 2).

La consommation de fourrages riches en TC a rarement un effet anthelminthique au sens strict, caractérisé par l'élimination des vers. Elle a été plutôt associée à des perturbations d'étapes clés du cycle des nématodes, dont la synergie contribue à freiner la dynamique des infestations.

ENCADRÉ 2

Effets principaux associés à la consommation de plantes riches en tannins condensés

► Effet sur la contamination du milieu extérieur en éléments infestants

L'effet sur la contamination du milieu extérieur est expliqué par des baisses significatives d'excrétion fécale d'œufs de parasites dans l'environnement chez les animaux consommant ces fourrages. Des réductions de 50 à 70 % ont été mentionnées. Ce déficit de production d'œufs a été relié soit à une baisse de fertilité des vers femelles adultes, soit à un nombre

réduit de vers adultes présents [2, 14].

► Effet sur le succès d'installation des larves de stade 3, lors de l'étape initiale d'infestation de l'hôte

Lors de l'étape initiale d'infestation de l'hôte, des réductions du succès d'installation des larves de stade 3 atteignant 50 à 70 % ont également été signalées. Elles s'expliqueraient par des perturbations sévères de la biologie des larves infestantes.

Si les niveaux de réduction n'atteignent jamais 100 %, ils sont voisins de seuils décrits comme permettant une maîtrise du parasitisme compatible avec la plupart des objectifs de production [19]. Par ailleurs, la distribution de ces fourrages a souvent été associée à des effets positifs sur la capacité des animaux à supporter le parasitisme (la résilience) mesurée par de meilleurs indices zootechniques ou par des signes cliniques moins sévères [14, 29, 30].

► Toutefois, une variabilité des effets sur les populations de vers a été rapportée en fonction de :

- l'espèce parasite visée ;
- l'hôte concerné ;
- la ressource utilisée [25].

Acquérir une meilleure connaissance des mécanismes d'action impliqués est donc un impératif pour déterminer l'origine de ces variabilités et ainsi exploiter de manière plus judicieuse ces ressources en élevage.

2. Mécanisme d'action des plantes riches en tannins

La plupart des données disponibles relient l'activité AH des tannins à l'hypothèse d'un effet direct, de type pharmacologique. Dans ce cadre, les effets des TC sur les vers dépendraient des contacts entre tannins libres dans la lumière digestive et certaines molécules constitutives (notamment les protéines) des nématodes, et seraient influencés par les conditions physiologiques locales. Toutefois, il importe de comprendre quelle est la nature des composés en cause, à quelle dose et comment ils agissent sur les vers et enfin, quels sont les principaux facteurs modulant ces interactions.

Les composés actifs

► De manière très générale, les propriétés toxiques ou thérapeutiques des plantes sont associées à des métabolites secondaires, de nature biochimique variée, qui servent notamment de défense vis-à-vis d'agresseurs potentiels. Les légumineuses contiennent plusieurs composés biochimiques dont le rôle peut être suspecté dans les effets AH constatés mais des résultats *in vitro* et *in vivo* ont renforcé l'hypothèse d'un rôle central joué par les tannins condensés [28].

► Ces substances polyphénoliques se caractérisent par leur capacité à former des complexes plus ou moins stables avec les protéines les rendant ainsi moins dégradables (tannage). Selon les composants constitutifs de base, leurs propriétés et leur métabolisation, les tannins se répartissent en deux grandes catégories : les tannins hydrolysables (TH) et les tannins condensés (TC) [28]. Les légumineuses d'intérêt ne contiennent que des TC et pas de TH, ce qui explique que les premiers nommés ont été prioritairement désignés comme responsables des effets AH. Cette hypothèse a été confirmée lors d'essais *in vitro* répétés montrant la disparition des effets antiparasitaires après addition d'inhibiteurs de tannins, ou au contraire, confirmant l'activité avec des fractions purifiées de TC [14]. Ces conclusions issues du laboratoire ont été confortées *in vivo* chez les ovins et les caprins par un nombre plus restreint d'études [2, 4, 32, 33].

► De multiples études *in vitro*, fondées sur une grande variété de modèles, en terme d'essais ou de légumineuses

objets des études, ont montré que l'activité AH dépend des concentrations présentes, avec la nécessité de dépasser une concentration seuil pour obtenir des effets significatifs [2, 14, 26]. Des études *in vivo* moins abondantes confirment l'idée d'une relation dose-effet chez l'animal [2, 4, 27].

► Toutefois, il apparaît que la qualité (nature du monomère de base) et la structure des TCs (taille, poids moléculaire) influencent aussi l'activité antiparasitaire. Par exemple, parmi les quatre classes de TC, répertoriées selon le monomère de base constitutif, les prodelphinidines (PD) seraient plus efficaces que les procyanidines (PC) [4]. En ce qui concerne les applications en élevage, une meilleure compréhension des relations structure/activité devrait conduire à privilégier certaines espèces ou variétés dont le rapport PD/PC est élevé [25].

Mode d'action sur les vers

► Lors d'essais chez les animaux, des différences d'efficacité ont été constatées selon les espèces de nématodes impliquées, des effets plus sévères ayant souvent été notés sur les vers de l'abomasum (genre *Haemonchus* ou *Teladorsagia*) par rapport aux espèces de l'intestin grêle (genre *Trichostrongylus* ou *Nematodirus*) [2, 13]. Ces variations peuvent indiquer une réelle différence de sensibilité aux TC selon l'espèce en cause. Toutefois, lors d'essais *in vitro*, de telles différences d'activité spécifique pour un même extrait de plantes riches en TC se sont révélées beaucoup moins flagrantes [3]. L'hypothèse est posée que ces variations d'effets *in vivo* seraient plutôt liées à des différences d'exposition des vers aux tannins selon les conditions locales dans les organes infestés.

► Le mode d'action des TC sur les nématodes demeure mal connu. Quelques études récentes ont cherché à déterminer comment les tannins peuvent perturber la phase initiale d'installation des larves de stade 3, qui représente le stade assurant la transition entre milieu extérieur et l'animal (figure 2). Les résultats suggèrent que les tannins agiraient sur les larves par leur capacité à se complexer aux protéines. Ces interactions entre tannins et protéines des larves seraient à l'origine de lésions cellulaires sévères et de perturbations fonctionnelles affectant les deux étapes aboutissant à l'invasion des muqueuses digestives : le dégaineement et la pénétration dans les muqueuses [4].

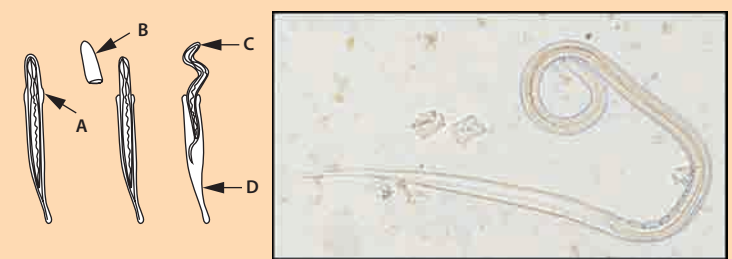
NUTRITION ET AMÉLIORATION DE LA RÉPONSE AUX INFESTATIONS

► L'infestation du tractus digestif par des strongles se traduit par des lésions et des perturbations fonctionnelles multiples, y compris de sévères pertes sanguines lorsque des espèces hématophages (*Haemonchus contortus*) sont présentes. Trois processus physiopathologiques principaux surviennent alors :

- une baisse d'appétit ;
- un syndrome de maldigestion/malabsorption ;

FIGURE 2

Effet de la consommation de fourrages riches en tannins sur l'étape initiale de la phase parasitaire



L'étape initiale de la phase parasitaire du cycle (le dégaineement des larves de stade 3) est affectée lors de consommation de fourrages riches en tannins par les ruminants.

- une réorientation des nutriments absorbés vers des synthèses exagérées dans les muqueuses digestives, le foie, la moelle osseuse au détriment du muscle ou de la mamelle. Pour résumer, le "coût" du parasitisme s'exprime par une moindre efficacité nutritionnelle à laquelle s'ajoutent des besoins supplémentaires pour maintenir les homéostasies sanguines et tissulaires et assurer la survie de l'hôte.

► De nombreuses études soulignent que les déficits et les besoins excédentaires concernent d'abord le métabolisme azoté [5]. De plus, en zone tempérée, les protéines sont souvent le principal facteur nutritionnel limitant pour la production chez les ruminants.

► Partant des résultats de ces études physiopathologiques, l'idée a été très tôt exprimée que par une adaptation de la ration, en particulier en augmentant la composante protéique, il serait possible de limiter le parasitisme et ses effets néfastes, voire de favoriser la réponse de l'animal face aux strongles [5]. La validité du concept a reçu de multiples confirmations, notamment chez les petits ruminants, en exploitant diverses ressources riches en azote, y compris des sources d'azote non protéiques comme l'urée [21]. De manière générale, des conséquences favorables sur les performances zootechniques (croissance ou production de lait) ont été associées à ces complémentations (meilleure résilience de l'hôte), alors que des améliorations de la résistance (la réponse de l'hôte perturbant l'installation, développement, reproduction ou survie des nématodes) ont été plus rarement notées (encadré 3).

► Les possibilités associées à la manipulation de la composante énergétique de la ration ont été moins étudiées. Les résultats les plus nets ont été obtenus en zones tropicales, pendant la saison humide, dans des circonstances où l'énergie est suspectée d'être le facteur limitant de la ration en raison de l'abondance de légumineuses riches en protéines présentes dans l'environnement [36, 37].

► Malgré le nombre important d'études consacrées aux interactions portant sur des aspects quantitatifs de la ration, les applications en élevage demeurent restreintes. La première raison est la difficulté de mesurer avec précision les déficits nutritionnels induits par les vers et

ENCADRÉ 3

Intérêt de l'amélioration de la ration par apport protéique

L'amélioration de la ration par apport protéique se révèle particulièrement profitable durant la période de *periparturient rise*⁽¹⁾ (PPRI) chez les brebis ou les chèvres, de manière à réduire ce phénomène qui contribue à renforcer la contamination initiale de l'environnement au moment des mises bas. Ainsi, chez des chèvres laitières, l'apport de rations couvrant 125 ou 145 % des besoins théoriques en protéines, distribués 3 semaines avant et 3 semaines après la mise bas a permis de fortement réduire, voire d'annihiler, le phénomène de PPRI [5, 8].

(1) Augmentation du nombre d'œufs de nématodes émis par les femelles autour du part.

par conséquent, d'ajuster les complémentations avec précision. La seconde raison est d'ordre économique. Les bénéfices pour les troupeaux infestés sont d'autant plus marqués que les complémentations reposent sur des ressources locales de faible valeur marchande. En ce sens, les données obtenues en zones tropicales, avec des mélanges ANP (azote non protéique)/ressources énergétiques (blocs urée/mélasse) ou source d'énergie exclusivement sont celles qui ouvrent les plus grands champs d'application [21, 36, 37]. En région tempérée, il convient d'éviter toute combinaison néfaste entre parasitisme digestif par les strongles et malnutrition, comme le souligne l'aphorisme : « *Nourrissez bien vos animaux, ils s'occuperont des parasites !* ».

GÉRER LE PARADOXE DU PÂTURAGE PAR LE COMPORTEMENT ALIMENTAIRE

1. Comportement et évitement du risque parasitaire

► Des études comparant l'intensité d'infestations par des nématodes gastro-intestinaux chez des moutons ou des chèvres adultes lors de pâturage commun selon l'environnement fournissent un des exemples les plus démonstratifs de la complexité des interactions entre l'environnement (et le mode de conduite), le parasitisme et le comportement alimentaire des ruminants [15]. En système herbager strict, les chèvres sont nettement plus infestées que les moutons. À l'inverse, en système pastoral complexe, les caprins souffrent beaucoup moins du parasitisme que les ovins. Ces différences ont été attribuées aux modes de comportement différenciés. Si le mouton est avant tout un "brouteur", la chèvre, si les conditions de pâturage le permettent, exprime plus facilement son

aptitude à cueillir les feuilles d'arbustes divers et réduit ainsi son exposition aux larves de stade 3 infestantes. De telles différences comportementales à l'origine de profondes disparités dans les infestations ont aussi été retrouvées, en comparant des races caprines selon leur propension à exploiter ou non les garrigues et les sous-bois [13].

► Ces mécanismes comportementaux d'évitement interviennent également à des échelles plus subtiles. Ainsi, une série d'études en Écosse a porté sur le comportement alimentaire des moutons à proximité des fèces, qui sont à la fois des zones de risque parasitaire accru, mais aussi des endroits où l'herbe est à meilleure valeur nutritionnelle, en raison de sa richesse en azote [17]. Les facteurs liés au statut parasitaire des animaux (infestés ou non, prémunis ou non), à l'âge et au risque plus ou moins important représenté par les fèces, ont été examinés pour comprendre les mécanismes gouvernant les compromis entre nécessité de couverture des besoins nutritionnels et gestion d'un risque identifié de "microprédation"⁽¹⁾ [6, 17]. Ces données théoriques ont commencé à déboucher sur des recommandations pratiques en élevage, comme l'exploitation du pâturage en mixité entre ovins et bovins qui permet de limiter le parasitisme par les SGI, mais aussi, dans une certaine mesure, de gérer les refus [7].

2. Comportement alimentaire et automédication ?

► Les premières données validant l'hypothèse de la capacité d'animaux à se traiter en sélectionnant dans leur environnement des plantes à propriétés médicinales ont été obtenues chez des primates [16, 22].

► Les premières données suggérant que de tels comportements pourraient aussi exister chez les ruminants ont été obtenues par référence aux possibles effets favorables d'une amélioration de la part protéique de la ration sur la réponse de l'hôte face aux vers [23]. Des moutons maintenus en cages individuelles, ont eu la possibilité de choix entre deux rations isoénergétiques, mais à faible (LP) ou haut (HP) niveau de couverture protéique des besoins. Lors d'infestations du tube digestif par des strongles, la proportion de consommation de la ration HP a significativement augmentée puis est revenue à des valeurs d'ingestion proches de celles des moutons non infestés, après traitement anthelminthique.

► Les travaux pour examiner l'hypothèse de sélection de ressources riches en composés bioactifs, à activité anthelminthique, par les herbivores parasités commencent à se multiplier [19, 38, 39]. En explorant le modèle fourni par les tannins condensés, des études successives ont montré que les ovins tendent à accroître leur consommation d'une ration enrichie en tannins lors de parasitisme par des SGI [24, 39]. Ces résultats préliminaires sont à confirmer et les mécanismes impliqués, probablement très complexes, restent à analyser. Néanmoins, ces données suggèrent qu'à condition que l'environnement le permette, les herbivores pourraient, tout comme les primates, choisir des plantes bénéfiques à leur santé. Ces données illustrent aussi l'intérêt de démarche visant à préserver la biodiversité botanique des prairies ou parcours qui paraît contribuer à la qualité des produits d'origine animale mais pourrait aussi influencer sur le bien-être des ruminants [9].

(1) Les parasites étant assimilés à des prédateurs, mais "minimalistes", cachés, et sur le long terme.

Conclusion

Les interactions entre nutrition et parasitisme par les strongles gastro-intestinaux sont multiples. Les études en cours abordant les divers volets de ces relations n'ont pas encore conduit à des recommandations très abouties applicables sur le terrain. Cependant, une meilleure connaissance de ces interactions devrait permettre à moyen terme de proposer des solutions complémentaires aux molécules chimiques afin de réduire leur fréquence d'emploi et de freiner ainsi le développement des résistances dans les populations de vers. ■

REMERCIEMENTS

Fotini Manolaraki, Célia Arroyo Lopez et Nadia Ojeda Robertos ont été bénéficiaires de bourses obtenues dans le cadre du projet Marie Curie Healthy Hay (contract: MRTN-CT2006-035805). L'appui financier de l'action Cost FA-0805 Capara et du projet *Low Input Breed* est également remercié.

Références

- Andlauer W, Fürst P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Res. Int.* 2002;35:171-176.
- Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson FJ et coll. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep *in vitro* and *in vivo* studies. *Vet. Parasitol.* 2001;99: 205-219.
- Brunet S, Hoste H. The effects of condensed tannins on the exsheathment of nematode larvae depend on the biochemical structure of flavan-3-ols and on the parasite species. *J. Agr. Food. Chem.* 2006;54:7481-7487.
- Brunet S. Analyse des mécanismes d'action de plantes riches en substances phénoliques sur les nématodes du tube digestif des ruminants. Thèse d'université Toulouse III. Novembre 2008.
- Coop RL, Kyriazakis I. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends Parasitol.* 2001;17:325-330.
- Cooper J, Gordon IJ, Pike AW. Strategies for the avoidance of faeces by grazing sheep. *Appl. An. Behav. Sci.* 2000;69:15-33.
- Dumont B, Meuret M, Boissy A et coll. Le pâturage vu par l'animal : mécanismes comportementaux et applications en élevage. *Fourrages.* 2001;166:213-238.
- Etter E, Chartier C, Hoste H et coll. The influence of nutrition on the periparturient rise in fecal egg counts in dairy goats: results from a two-year study. *Rev. Med. Vet.* 1999;150:975-980.
- Farrugia A, Martin B, Prache S et coll. Intérêt de la diversité floristique des prairies permanentes pour les ruminants et les produits animaux : état des connaissances. *Inra Prod. Anim.* 2008;21:181-200.
- Foucher F, Luzerne et sainfoin : la filière déshydratation en plein bouleversement. *L'alimentation Animale.* 2011;649:64-72.
- Heckendorn F, Häring DA, Maurer V et coll. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Vet. Parasitol.* 2006;142: 293-300.
- Heckendorn F, Häring DA, Maurer V et coll. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Vet. Parasitol.* 2007;146:123-134.
- Hoste H, Leveque H, Dorchie P. Comparison of nematode infections of the gastrointestinal tract in Angora and dairy goats in a rangeland environment: relations with the feeding behaviour. *Vet. Parasitol.* 2001;101:127-135.
- Hoste H, Jackson FJ, Athanasiadou S et coll. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 2006;32:253-261.
- Hoste H, Sotiraki S, Landau SY et coll. Goat nematode interactions: think differently ! *Trends Parasitol.* 2010;26:376-381.
- Huffman MA. Self medication by primates and humans: exploitation of medicinal properties of plants. *Proc. Nutr. Soc.* 2003;62:371-381.
- Hutchings MR, Kyriazakis I, Gordon IJ et coll. Trade-offs between nutrient intake and faecal avoidance in herbivore foraging decisions: the effect of animal parasitic status, level of feeding motivation and sward nitrogen content. *J. Anim. Ecol.* 1999;68:310-323.
- Jackson FJ, Varady M, Bartley D. Managing anthelmintic resistance in goats - Can we learn lessons from sheep ? *Small. Rum. Res.* 2012. In press.
- Kavaliers M, Colwell DD, Choleris E. Parasites and behavior: an ethnopharmacological analysis and biomedical implications. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1999;23:1037-1045.
- Ketzis JK, Vercruyse J, Stromberg BE et coll. Evaluation of efficacy expectations for novel and non chemical helminth control strategies in ruminants. *Vet. Parasitol.* 2006;139:321-335.
- Knox MR. Impact of non protein nitrogen supplements on nematode infected sheep. *Aust. J. Exp. Agric.* 2003;43: 1463-1468.
- Krief S, Hladik CM, Haxaire C. Ethnomedicinal and bioactive properties of plants ingested by wild chimpanzees in Uganda. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 101:1-15.
- Kyriazakis I, Oldham JD, Coop RL et coll. The effect of subclinical intestinal nematode infection on the diet selection of growing sheep. *Vet. Parasitol.* 1994;72:665-677.
- Lisonbee L, Villalba JJ, Provenza FD et coll. Tannins and self medication: implications for sustainable parasite control in herbivores. *Behav. Processes.* 2009;82:84-189.
- Manolaraki F. Propriétés anthelmintiques du sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*): Analyse des facteurs de variations et du rôle des composés phénoliques impliqués. Thèse d'université (INP Toulouse). Janvier 2011.
- Manolaraki F, Sotiraki S, Skampardonis V et coll. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology.* 2010;137:685-696.
- Min BR, Hart SP. Tannins for suppression of internal parasites. *J. Anim. Sci.* 2003;81:102-109.
- Mueller-Harvey I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 2006;86: 2010-2037.
- Niezen JH, Waghorn TS, Charleston WAG et coll. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *J. Agric. Sci.* 1995;125:281-289.
- Niezen JH, Waghorn GC, Charleston WAG. Establishment and fecundity of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in lambs fed lotus (*Lotus pedunculatus*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Vet. Parasitol.* 1998;78:13-21.
- Novobilsky A, Mueller-Harvey I, Thamsborg SM. Condensed tannins act against cattle nematodes. *Vet. Parasitol.* 2011;182:213-220.
- Paolini V, Dorchie P, Hoste H. Effects of sainfoin hay on gastrointestinal infection with nematodes in goats. *Vet. Rec.* 2003;152(19):600-601.
- Paolini V, Frayssines A, De La Farge F et coll. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Vet. Res.* 2003;34(3): 331-339.
- Rochfort S, Parker AJ, Dunshea FR. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry.* 2008;69:299-322.
- Terrill TH, Mosjidis JA, Moore DA et coll. Effect of pelleting on efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats. *Vet. Parasitol.* 2007;146:117-122.
- Torres-Acosta JFJ, Jacobs D, Aguilar-Caballero AJ et coll. The effect of supplementary feeding on the resilience and resistance of browsing Criollo kids against natural gastrointestinal nematode infections during the rainy season in tropical Mexico. *Vet. Parasitol.* 2004;124:217-238.
- Torres-Acosta JFJ, Jacobs DE, Aguilar-Caballero AJ et coll. Improving resilience against natural gastrointestinal nematode infections in browsing kids during the dry season in tropical Mexico. *Vet. Parasitol.* 2006;135:163-173.
- Villalba JJ, Provenza FD. Self-medication and homeostatic behaviour in herbivores: Learning about the benefits of nature's pharmacy. *Animal.* 2007;1:1360-1370.
- Villalba JJ, Provenza FD, Hall JO et coll. Selection of tannins by sheep in response to gastrointestinal nematode infection. *J. Anim. Sci.* 2010;88:2189-2198.
- Waller PJ. From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Vet. Parasitol.* 2006;139:1-14.

ARTICLE 6: Spécificités des risques parasitaires des chèvres au pâturage: conséquences sur les modes de gestion.

Authors

HOSTE, H.^{1,2}, MANOLARAKI, F.^{1,2}, **ARROYO LOPEZ, C.**^{1,2}, TORRES ACOSTA, J.F.J.³, SOTIRAKI, S.⁴

¹ : UMR 1225 IHAP INRA/ENVT, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23, Chemin des Capelles, F-31076 Toulouse cedex.

² : Université de Toulouse; ENVT ; UMR 1225 ; F-31076 Toulouse, France.

³ : Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5, carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán (Mexique)

⁴ : NAGREF-VRI NAGREF Campus, Thermi 57001, PO Box 60272, Thessaloniki (Grèce)

Fourrages, 212, 319-328, (2012).

Spécificités des risques parasitaires des chèvres au pâturage : conséquences sur les modes de gestion

H. Hoste^{1,2}, F. Manolaraki^{1,2}, C. Arroyo-Lopez^{1,2}, J.F.J. Torres Acosta³, S. Sotiraki⁴

Le pâturage occupe une place limitée en élevage caprin laitier. Il pourrait se développer dans la perspective d'une réduction des charges et sous l'effet de la demande sociétale mais il est un motif d'inquiétude pour les éleveurs car les chèvres sont particulièrement sensibles aux risques parasitaires, notamment par les helminthes qui se transmettent au pâturage.

RÉSUMÉ

L'exploitation du pâturage par les chèvres suppose la prise en compte d'un certain nombre de facteurs pouvant affecter la production de lait. Cet article de synthèse présente les risques encourus, évoque les particularités de réponse des chèvres vis-à-vis des divers groupes de parasites et expose les répercussions sur la maîtrise du parasitisme. Les strongyloses gastro-intestinales (dus aux helminthes) sont plus particulièrement abordées en raison de leur fréquence chez les troupeaux au pâturage et de leurs répercussions économiques. Alors que l'emploi exclusif des traitements thérapeutiques montre ses limites, les différents principes de maîtrise de ces parasitoses sont précisés (alternance, dosage et administration ciblée des traitements, gestion du pâturage, légumineuses riches en tanins...).

SUMMARY

Specific parasitic diseases in grazing goats: consequences on animal management

So far, dairy goat farms have made a limited use of pasture for grazing. The current context pleads in favour of promoting this type of system, unfortunately goats are highly prone to parasitic infections, and more precisely intestinal helminths, which tend to spread when goats are grazing outdoors. This article reviews identified risks and the specific response of goats to different types of outdoor parasites. It also investigates the overall impact on the strategies that need to be implemented in order to control parasitic infections in goats. Gastrointestinal strongyles (helminths) are the main type of infection taken into consideration owing to their high prevalence in grazing herds and their economic impact. Relying exclusively on chemical drugs yields limited results, therefore different strategies are reviewed which can help control this kind of parasite (alternating and targeting treatments, drug dose and mode of administration, pasture management, tannin-rich legumes...).

1. L'évolution des critères de production en élevage caprin laitier

Le cheptel caprin français dépasse le million de têtes. Au sein de l'Union Européenne, ces chiffres en font le troisième troupeau par le nombre d'animaux après la Grèce et l'Espagne (EUROPA, 2011). Toutefois, en termes de quantité de lait produit, qui est la vocation quasi

exclusive de l'élevage caprin en France, **notre pays demeure le premier producteur européen**, ce qu'explique en grande partie la sélection génétique opérée sur des critères de production laitière. Dans un passé récent, cet objectif a souvent été associé à la recherche d'une maîtrise optimale des facteurs alimentaires et sanitaires pouvant affecter la production. Dans de nombreuses régions, et particulièrement dans l'Ouest de la France,

AUTEURS

1 : UMR 1225 IHAP INRA/ENVET, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23, Chemin des Capelles, F-31076 Toulouse cedex ; h.hoste@envt.fr

2 : Université de Toulouse; ENVET ; UMR 1225 ; F-31076 Toulouse, France.

3 : Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5, carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán (México)

4 : NAGREF-VRI NAGREF Campus, Thermi 57001, PO Box 60272, Thessaloniki (Greece)

MOTS CLÉS : Caprin, gestion du troupeau, lutte raisonnée, nématode, parasitisme, pâturage, pâturage mixte, prairie, résistance aux maladies, strongylose.

KEY-WORDS : Flock management, goats, grassland, grazing, integrated control, mixed grazing, nematode, parasitism, resistance to diseases, strongylosis.

RÉFÉRENCE DE L'ARTICLE : Hoste H., Manolaraki F., Arroyo-Lopez C., Torres Acosta J.F.J., Sotiraki S. (2012) : "Spécificités des risques parasitaires des chèvres au pâturage : conséquences sur les modes de gestion", *Fourrages*, 212, 319-328.

cette démarche a souvent abouti au développement d'élevages caprins hors sol afin de standardiser les apports nutritionnels et les conditions d'élevage.

Cependant, diverses crises sanitaires et la considération accrue apportée au bien-être animal expliquent que les demandes des consommateurs sont croissantes en faveur d'une Agriculture Durable, dont les critères incluent la promotion de concepts tels que la réduction des intrants chimiques en élevage ou la meilleure prise en compte de la biodiversité, de l'environnement et du bien-être animal. Ces critères se retrouvent à des degrés divers dans les cahiers des charges de mode de production de qualité (par exemple de type AOC lait ou Agriculture Biologique). Une telle démarche participe à une meilleure image des produits (ou plutôt à une meilleure adéquation entre l'image présentée et les réalités des conditions d'élevage) censée aboutir à une meilleure valorisation des produits, qu'ils soient carnés ou laitiers.

En élevage de ruminants, une des réponses les plus évidentes à cette attente sociétale consiste en **un retour des herbivores à leur ressource naturelle**. Cette démarche s'exprime souvent par le terme « retour à l'herbe », ce qui mériterait d'être nuancé pour les caprins. C'est aussi un retour vers l'acceptation d'une diversité de systèmes d'élevage correspondant à des risques accrus de ruptures nutritionnelles ou de menaces sanitaires nouvelles, mais aussi à l'exploration et l'exploitation d'une plus grande diversité de solutions offertes par l'environnement.

Chez les caprins, la possibilité de produire un maximum de lait (jusque 1 200 kg par lactation individuelle) par une gestion optimisée et raisonnée du pâturage herbacé a été illustrée depuis près de 20 ans par les travaux menés à la station du Pradel (LEFRILEUX *et al.*, 2008 et 2012). Cet article vise pour sa part à évoquer les principaux risques parasitaires liés à l'exploitation du pâturage par les caprins, leurs spécificités de réponse et les répercussions sur la gestion du parasitisme.

2. Les risques parasitaires au pâturage

L'importance d'une pathologie (qu'elle soit d'origine parasitaire ou non) dans une population animale dépend de plusieurs facteurs :

- l'exposition des animaux aux agents infestants et leur réceptivité, qui détermine la fréquence et la répartition géographique plus ou moins large des cas rencontrés ;
- l'impact des pathologies provoquées, en termes :
 - de santé publique (agents potentiels de zoonoses, c.a.d. risques de maladies transmises de l'animal à l'homme) ;
 - de risques généraux d'extension de pathologies sévèrement délétères pour les élevages à l'échelle territoriale ou nationale (*Maladie Légale Réputée Contagieuse*) ;
 - d'économie des élevages en cause.

Pour résumer, en dehors d'agents pathogènes responsables de zoonoses pour lesquels le raisonnement appliqué pour la maîtrise de ces pathologies se doit d'être qualitatif, l'importance générale d'une parasitose dépend de la fréquence et de la plus ou moins large répartition géographique des cas rencontrés et des conséquences économiques provoquées dans l'élevage (pertes de production, signes cliniques, mortalités éventuelles).

- Par ailleurs, la disponibilité de moyens de maîtrise efficaces, de nature thérapeutique ou non, est un troisième critère à considérer. Ces aspects seront abordés dans le chapitre 3 à propos des modes de maîtrise potentiels des parasitoses au pâturage chez les chèvres.

■ Pâturage et exposition aux agents infestants des principales parasitoses

L'exploitation du pâturage n'est pas synonyme de risque parasitaire général accru, mais plutôt d'une **augmentation des risques vis-à-vis de certains groupes de parasites**.

La réduction de concentration des animaux qui souvent accompagne leur sortie à l'extérieur va aussi de pair avec une moindre exposition à certains parasites, comme des protozoaires à transmission directe (figure 1), agents des coccidioses ou de la cryptosporidiose. Ces pathologies là sont avant tout des maladies de chèvrerie. C'est également le cas de certains parasites externes : des insectes, comme les poux ou les puces, et des acariens agents de certaines gales. Leur présence est favorisée par la concentration prolongée des animaux en bâtiments.

A l'inverse, l'élevage en extérieur correspond à un risque plus important de rencontre avec d'autres insectes (ex. *Oestrus ovis*, ou d'autres agents de myiases) ou acariens (ex. les tiques). Enfin, de manière très générale, **le pâturage correspond surtout à une plus large exposition aux vers** (les Helminthes) ce qui inclut trois groupes taxonomiques distincts : les Trématodes (les douves), les Cestodes (les ténias) et les Nématodes (les strongles pulmonaires ou digestifs). Seules les infestations par *Strongyloides papillosus* représentent un cas particulier puisque leur cycle peut se réaliser en chèvrerie. Cette plus grande exposition aux éléments infestants d'helminthes tient aux cycles biologiques des parasites qui nécessitent un passage dans le milieu extérieur avec ou sans intervention d'hôtes intermédiaires (figure 1). Dans la plupart des cas, ces helminthes sont communs aux ovins et aux caprins alors que des espèces voisines infestent les bovins. La prévalence et le pouvoir pathogène de ces vers chez les caprins varient, ce qui justifie les mesures de maîtrise plus ou moins drastiques appliquées.

Ce concept de risque d'exposition potentiel est à moduler en fonction du comportement particulier des chèvres. Ainsi, leur aversion pour les zones humides explique que les cas d'infestations par la grande douve (*Fasciola hepatica*) restent rares en comparaison aux ovins. A l'inverse, les infestations par des paramphistomes (*Calicophoron daubneyi*), dont le cycle biologique

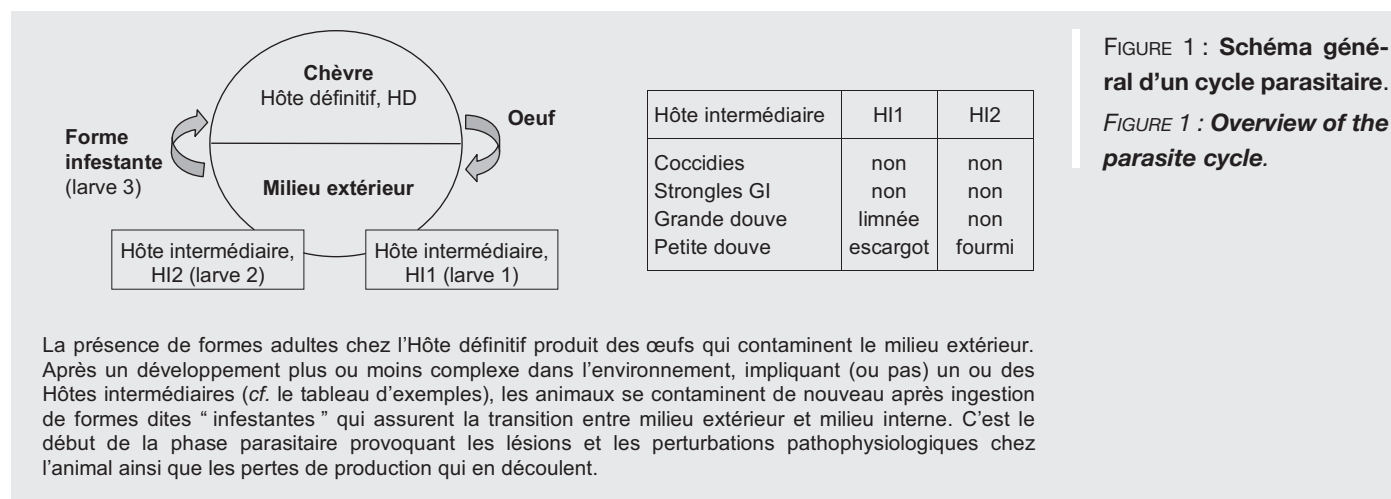


FIGURE 1 : Schéma général d'un cycle parasitaire.

FIGURE 1 : Overview of the parasite cycle.

est voisin de celui de *F. hepatica* sont régulièrement rapportés dans certains territoires. Ces cas semblent souvent liés à un partage de pâturage avec des bovins (PARAUD *et al.*, 2009).

■ Importance relative des parasitoses du pâturage chez les caprins

• Zoonoses

Parmi les agents potentiels de zoonoses présents chez les caprins élevés au pâturage, seule la présence de la grande douve (*F. hepatica*) semble à considérer. Toutefois, les particularités de comportement des caprins signalées précédemment en font un réservoir mineur puisque les cas de fasciolose caprine demeurent rares.

• Importance économique

Par rapport aux ovins, les **cas de myiases** cutanées des caprins par *Lucilia sericata* et *Wohlfartia magnifica* restent rares. De plus, pour *W. magnifica*, la répartition des mouches est restreinte à quelques régions, compte tenu de son habitus à évoluer dans des zones au-delà d'une altitude de 700 à 800 mètres.

La myiase des cavités nasales due aux larves d'*Oestrus ovis* est pour sa part très largement présente dans les principaux bassins d'élevage caprin. Cependant, la prévalence et les conséquences des infestations dans un troupeau sont de manière générale moins élevées et moins sévères que chez les ovins. Ceci pourrait s'expliquer par des différences de comportement des chèvres plus aptes à se réfugier dans des espaces moins ouverts (garrigues, sous-bois). De plus, les conséquences cliniques mineures s'expliqueraient aussi parce qu'une part importante des phénomènes pathologiques liés à la présence des larves dans les cavités nasales serait liée aux réactions de l'hôte (comme dans les phénomènes d'asthme) et que celles-ci sont moindres chez les chèvres que chez les moutons (NGUYEN *et al.*, 1999).

Pour les principales **helminthoses du pâturage**, les études les plus nombreuses concernent les **strongyloses gastro-intestinales (SGIs)** en raison de leur fréquence et

de leur ubiquité géographique. Des données répétées indiquent un effet d'infestations subcliniques sur la quantité de lait produit voire sur certains paramètres de qualité (Taux butyreux) (HOSTE et CHARTIER, 1993). De plus, en l'absence de mesures appropriées de régulation des populations vermineuses, des signes cliniques sévères digestifs ou d'anémie peuvent se développer et même conduire à des mortalités, en particulier lors de la présence de l'espèce hématophage *Haemonchus contortus*.

L'agent des **strongyloses pulmonaires** des caprins (*Muellerius capillaris*) est extrêmement fréquent (CHARTIER et RÉCHE, 1992) mais son pouvoir pathogène direct reste discuté (CHARTIER, 2010). De manière générale, la présence des formes larvaires enkystées dans les poumons semble assez bien supportée par les caprins. Dans un nombre réduit de cas, une pathologie plus sévère est observée. Elle serait surtout liée à des surinfections bactériennes ou virales, favorisées par les lésions créées par l'activation des larves ou la réaction de l'hôte face aux formes enkystées.

La présence de **ténias** (*Moniezia expansa*) est souvent identifiée en élevage par l'émission dans les fèces d'anneaux taenifuges, souvent décrits comme des « grains de riz ». Toutefois, cette détection signe de manière générale un simple « portage » par les chèvres adultes sans conséquences graves, en raison d'une bonne réponse immunitaire. Comme chez les agneaux, des cas de taeniasis (due à des infestations par des Cestodes adultes) peuvent conduire à des répercussions subcliniques ou cliniques non négligeables chez les chevrettes. Cependant, plusieurs éléments contribuent à limiter l'importance de ces infestations : i) le mode de conduite des chevrettes les séparant en général des risques de transmission par les adultes, ii) une réponse immunitaire d'installation précoce et iii) l'efficacité des traitements disponibles.

Comme mentionné précédemment, en raison du comportement des chèvres, la présence de *F. hepatica* est rare. Lorsqu'elle est présente, la **grande douve** a souvent des conséquences graves. Les cas de **paramphistomoses** dues à *C. daubney* sont désormais beaucoup plus souvent signalés (PARAUD *et al.*, 2009). Cependant, les données objectives sur les conséquences pathologiques de la présence de ces « douves du rumen » chez les

caprins suggèrent que la pathologie serait d'abord liée aux passages des formes larvaires par l'intestin. La présence de vers adultes dans le rumen serait le plus souvent asymptomatique. Les infestations par la **petite douve** (*Dicrocoelium lanceolatum*) sont plus fréquentes en particulier en zones à sols basiques (terrains calcaires). Toutefois, en raison des difficultés pour disposer de modèles d'étude expérimentale, les conséquences pathologiques et économiques en situations subcliniques restent mal cernées, en dehors de situations d'infestations massives observées sur le terrain où des tableaux nécropsiques sévères et des conséquences sur la production ont été trouvés.

3. Modes de maîtrise des parasitoses au pâturage : spécificité des caprins

■ Principes généraux de maîtrise des parasitoses

Les principales parasitoses rencontrées au pâturage ont été évoquées dans le chapitre précédent. De manière générale, quelles que soient les conditions (à l'intérieur ou à l'extérieur), quatre principes gouvernent la maîtrise des pathologies (TORRES-ACOSTA et HOSTE, 2008) :

- **1/ Éliminer les agents pathogènes** : qu'ils soient ou non parasites, il s'agit d'intervenir par des traitements thérapeutiques visant à éliminer les « fauteurs de troubles pathologiques » chez l'hôte.

- **2/ Favoriser la réponse immunitaire de l'animal face aux agents pathogènes** : trois principaux « leviers », non exclusifs, sont habituellement décrits pour atteindre ce but : les vaccins, la qualité des apports nutritionnels et la sélection génétique orientée en faveur d'une résistance aux maladies.

- **3/ Réduire le contact entre l'animal et les éléments pathogènes infestants** : ce but hygiénique peut être atteint soit en réduisant la densité d'éléments infestants dans l'environnement (désinfection=prophylaxie sanitaire offensive), soit en réduisant les probabilités de contacts entre animaux sensibles et agents pathogènes (prophylaxie sanitaire défensive).

- **4/ Moduler la biologie des parasites** : dans le cas du parasitisme, correspondant à des infestations chroniques provoquant des pertes économiques sur le long terme, l'identification de substances capables de perturber la biologie des agents pathogènes pour freiner la dynamique des infections est un concept innovant exploré.

Jusqu'à présent, l'essentiel de la lutte contre les parasitoses a reposé sur le premier principe thérapeutique qui combinait facilité d'emploi, efficacité et faible coût. Pour illustrer les spécificités de réponse des caprins aux parasites en situation de pâturage et les nécessaires adaptations en découlant pour les méthodes de maîtrise du parasitisme, nous prendrons pour exemple principal

les strongyloses gastro-intestinales (SGIs) car elles demeurent les parasitoses de pâturage les plus largement présentes et les plus dommageables pour l'économie des élevages menés en extérieur.

Les mêmes espèces de Nématodes du tube digestif existent chez **les caprins et les ovins**. Toutefois, comme évoqué, certains éléments suggèrent que les deux espèces **ont développé, au cours de l'évolution, deux stratégies divergentes pour réguler les populations de vers** et leurs conséquences (HOSTE et al. 2010). Ces stratégies semblent liées initialement au comportement alimentaire différencié des chèvres et des moutons.

Les moutons, très inféodés à l'exploitation de l'herbe, ont été confrontés massivement aux infestations par les SGIs. Il est suspecté que ce challenge constant aurait favorisé la préservation de races ou de lignées ayant une meilleure résistance immune face aux SGIs. À l'inverse, lorsque l'environnement permet d'exprimer leur comportement usuel de « cueilleurs », les chèvres évitent le contact avec les éléments infestants des SGIs. Toutefois, cette exploitation de diverses ressources botaniques disponibles correspond à une confrontation répétée face à des métabolites potentiellement toxiques et, en conséquence, au développement d'une capacité accrue de métaboliser et d'éliminer de l'organisme des substances extérieures (xénobiotiques) parfois néfastes. À l'inverse, la sélection naturelle n'a pas favorisé chez les caprins la mise en place d'une résistance immune aux SGIs puisque le défi auquel est confronté un animal cueilleur restait faible (HOSTE et al., 2010). Cette absence de résistance se traduit par des niveaux d'infestations chez les animaux adultes comparables, voire supérieurs, à ceux des jeunes (HOSTE et CHARTIER, 1998 ; ALBERTI et al., 2012) alors que, chez les ovins, de nettes différences sont trouvées entre les brebis adultes et les jeunes animaux, y compris les antennes (primipares).

Il est suspecté que ces différences de stratégies « naturelles » ont toujours de profondes répercussions sur l'efficacité des diverses méthodes de maîtrise du parasitisme applicables chez les deux espèces de petits ruminants. **Même si caprins et ovins partagent les mêmes espèces de vers parasites, les modes de maîtrise des SGIs nécessitent des adaptations spécifiques aux caprins.**

■ Choix et efficacité des traitements anthelminthiques

En situation de pâturage strict, l'impossibilité pour les chèvres d'éviter les larves 3 infestantes et leur faible capacité à réguler par une réponse immune les populations vermineuses conduisent à des niveaux d'infestations qui imposent rapidement le recours répété aux traitements anthelminthiques (AHs). Cependant, plusieurs facteurs contribuent à restreindre les options thérapeutiques disponibles efficaces chez les caprins et à rendre complexe la gestion des SGIs en se fondant sur les seuls traitements antiparasitaires.

• Des restrictions de choix thérapeutiques liées à la production

95 % des chèvres en France sont élevées pour leur production de lait. De plus, en général, la lactation correspond aux périodes d'exploitation du pâturage et donc aux époques de challenge parasitaire plus intenses. La prise en compte de la production laitière signifie aussi des restrictions imposées sur le choix des AHs disponibles en limitant l'emploi de molécules interdites en lactation ou ayant des délais d'attente trop longs pour être économiquement viables. En pratique, cette situation a conduit à limiter le choix quasi exclusif à 3 molécules (fenbendazole, oxfendazole et fébantel) de la même famille d'AHs de synthèse (les benzimidazoles et probenzimidazoles) car elles sont sans « délai d'attente » en lactation. Les mêmes limites existent chez les ovins à vocation laitière mais ceux-ci ne représentent qu'environ 15 % du cheptel national et surtout l'immunité des brebis adultes face aux SGIs est bien plus efficace que chez les caprins.

• Adapter les traitements aux spécificités métaboliques des chèvres

Comme mentionné précédemment, des phénomènes évolutifs auraient favorisé chez les caprins la préservation d'aptitudes physiologiques et métaboliques pour exploiter des ressources botaniques riches en composés toxiques (HOSTE *et al.*, 2010). Une telle aptitude à éliminer plus rapidement de l'organisme des xénobiotiques s'exprime aussi pour nombre de molécules thérapeutiques, y compris les AHs (LESPINE *et al.*, 2012 ; GALTIER *et al.*, 1981 ; HENNESSY *et al.*, 1993). Les mêmes espèces de SGIs étant présentes chez les ovins et les caprins, il a longtemps été supposé que les données pharmacologiques acquises pour valider l'efficacité de molécules sur ovins étaient transposables aux caprins. Il a fallu plus de 20 ans avant que pharmacologistes et parasitologistes identifient que cette hypothèse était obsolète et en tirent les conséquences. En pratique, ce constat s'est traduit par la nécessité d'adapter les posologies des AHs de diverses familles pour aboutir à une efficacité comparable aux doses recommandées chez les ovins (CHARTIER et HOSTE, 1997).

• Des anthelminthiques théoriquement efficaces sur les strongyloses gastro-intestinales ?

Le recours fréquent aux traitements chimiques pour maîtriser les infestations, l'utilisation répétée de la même famille thérapeutique, le sous-dosage réitéré, lié à la méconnaissance des spécificités métaboliques de la chèvre sont autant de facteurs majeurs expliquant que la prévalence des résistances aux AHs, notamment aux benzimidazoles, est plus élevée en élevage caprin qu'en élevage ovin.

Les enquêtes les plus récentes (CHARTIER *et al.*, 2001) indiquent que **près de 80 % des élevages exploitant le pâturage doivent composer avec une résistance aux benzimidazoles (BZs)**. Cela veut dire que l'administration de molécules de cette famille n'est pas efficace à 100 % et

surtout que toute nouvelle application de ces molécules conduit à renforcer la résistance des populations de vers vis-à-vis de cette famille et donc à diminuer encore l'efficacité des futurs traitements. Des résistances des vers au lévamisole ont aussi été signalées (CHARTIER *et al.*, 2001) mais leur prévalence reste faible. En revanche, jusqu'à présent les suspicions de résistance aux lactones macrocycliques (avermectines et moxidectine) n'ont pas été confirmées (PARAUD *et al.*, 2010).

• A l'échelle mondiale, chèvres et brebis laitières représentent un marché mineur

Cette vision gouvernée par le marché a des conséquences sur la disponibilité future de nouvelles molécules antiparasitaires chez les caprins. Ainsi, de nouvelles familles de molécules AHs ont récemment (KAMINSKY *et al.*, 2008) ou vont être sous peu commercialisées chez les ovins allaitants. Toutefois, en raison de l'étroitesse du marché par rapport aux coûts de demandes d'Autorisation de Mise sur le Marché de nouvelles molécules, les possibilités de les voir développées pour les petits ruminants laitiers restent faibles.

■ Des recommandations pour mieux utiliser et préserver l'efficacité au long terme des molécules AHs disponibles chez les chèvres

Multiplier / Réitérer / Sous-doser et Généraliser les traitements sont les mots clefs expliquant de manière générale le développement des résistances aux AHs dans les populations de SGIs chez les ruminants.

L'importance des cas de résistances aux AHs, et notamment aux BZs, chez les caprins a conduit à formuler un certain nombre de recommandations et proposer des adaptations de la régulation pour fournir les moyens de gérer le parasitisme en élevage. Ces recommandations peuvent se résumer en quelques règles simples, qui prennent le contre-pied des mots clefs énoncés en tête de chapitre. Elles doivent être connues et appliquées par tout éleveur désirant mener un troupeau de chèvres au pâturage.

• Etablir un état des lieux du statut de résistance aux antiparasitaires chez les vers

Connaître le statut de résistance vis-à-vis des molécules habituellement employées dans un élevage est essentiel pour éviter de « traiter pour rien » et continuer d'être efficace. Des méthodes simples, fondées sur des coproscopies comparées avant et après traitements, permettent de fournir une information objective (BEUGNET et KERBOEUF, 1997 ; CABARET, 2012). Cette recommandation générale valable pour le troupeau est à appliquer avec encore plus de rigueur pour toute introduction de nouveaux animaux. Le principe de quarantaine ne concerne pas uniquement les portages de virus et de bactéries mais est aussi à appliquer aux parasites. Il est nécessaire de traiter contre les vers tout animal importé dans l'élevage

mais surtout de vérifier l'efficacité des traitements appliqués par coproscopies pour éviter d'introduire des souches résistantes.

En cas de résistance avérée aux BZs, il est possible de recourir à une autre famille de molécules sans Autorisation de Mise sur le Marché officielle pour les caprins selon le principe dit de « la cascade » (FRESNAY, 2004). Chez les chèvres laitières, l'éprinomectine est généralement le substitut préférentiel aux benzimidazoles. Cette démarche doit être encadrée par un vétérinaire.

• Adapter les posologies aux chèvres

Les travaux en pharmacologie comparée pour les diverses molécules ont permis de préciser les posologies nécessaires pour obtenir une efficacité équivalente à celle obtenue chez les ovins, compte tenu des spécificités métaboliques des chèvres et de leur capacité à éliminer plus rapidement les xénobiotiques de leur organisme. De manière générale, selon les molécules, les recommandations visent soit à augmenter la posologie, soit à répéter l'administration (CHARTIER et HOSTE, 1997 ; CHARTIER, 2010). Il est essentiel que ces recommandations soient diffusées et appliquées pour freiner le développement des résistances (HOSTE et al., 2000).

• Diversifier / Alternier les familles de molécules AHs

Des modèles mathématiques indiquent qu'une des méthodes les plus efficaces pour freiner le développement des résistances aux AHs consiste à alterner l'emploi des 3 familles de molécules disponibles (BARNES et al., 1995). Des rotations annuelles ont été proposées chez les ovins allaitants. Compte tenu des contraintes réglementaires sur l'emploi des AHs en élevage laitier, il semble que ce principe d'alternance doive d'abord s'articuler en fonction des périodes de lactation ou non. Si aucune résistance aux BZs n'est identifiée dans l'élevage, l'emploi du lévamisole ou de lactones macrocycliques est préconisé au tarissement, une année sur deux. Dans les élevages où l'éprinomectine est nécessaire en lactation, l'application de lévamisole doit être privilégiée hors lactation.

• Faut-il traiter tous les animaux d'un troupeau ?

De multiples études chez les ovins, caprins et bovins ont montré que tous les animaux d'un troupeau n'étaient pas égaux face au parasitisme et que seule une proportion mineure (30 à 40 %) des animaux du troupeau était fortement infestée et donc principale source de contamination du pâturage et des congénères (HOSTE et al., 2002b). Ces données ont conduit à proposer des méthodes innovantes de traitements sélectifs (décrites désormais sous l'abréviation anglaise de TST : *Targeted Selective Treatment*) afin de **restreindre l'usage des AHs aux seuls animaux souffrant le plus du parasitisme et constituant le risque le plus important pour le troupeau**. En termes de gestion des résistances, ce concept évite de généraliser les traitements et permet donc de freiner la diffusion des résistances aux AHs. L'intérêt

économique pour les éleveurs est évident en permettant d'obtenir une maîtrise des strongyloses équivalente à un traitement systématique en ne traitant que 50 à 60 % des animaux (HOSTE et al., 2002a et b ; KENYON et al., 2009 ; RINALDI et CRINGOLI, 2012).

En élevage caprin laitier, des données ont montré que, dans un troupeau, **les primipares et les chèvres présentant les meilleures performances de production** étaient particulièrement exposées aux SGIs (HOSTE et al., 2002b). Ces catégories constituent donc des cibles privilégiées pour appliquer les traitements en période de pâturage et de lactation.

Au tarissement, le principe d'alternance des familles d'AHs est d'abord à respecter. En revanche, le concept de traitement sélectif des animaux est contrebalancé par la volonté d'assurer un nettoyage le plus complet possible des chèvres avant la mise bas et le démarrage de la lactation et pendant une période sans utilisation du pâturage et risque de recontamination.

■ Des solutions non thérapeutiques de gestion des strongyloses gastro-intestinales

Les multiples difficultés rencontrées dans l'application des traitements AHs chez les chèvres laitières conduisent à envisager le recours à d'autres options pour compléter voire remplacer ces molécules chimiques, c'est-à-dire des modes de gestion fondés sur la stimulation de la réponse de l'hôte et sur la prise en compte approfondie des interactions entre les caprins et leur environnement. De manière générale, des solutions intégrées, visant à associer des moyens qui *a priori* ne sont pas efficaces à 100 % par eux seuls mais sont complémentaires dans leur principe d'action, sont désormais préconisées pour assurer une gestion à plus long terme des « interactions durables », comme sont parfois qualifiées les infestations parasitaires.

• Perturber la biologie des vers et en conséquence la dynamique des infestations

Depuis plus de 15 ans, des résultats cohérents se sont accumulés soulignant que la **consommation de certaines plantes riches en tannins, notamment des légumineuses fourragères** (exemple : sainfoin, lotiers corniculés et pédonculés, sulla ou *Sericea lespedeza*), pouvaient présenter un intérêt dans la gestion intégrée du parasitisme par les SGIs (HOSTE et al., 2006 ; ROCHFORD et al., 2008).

Il a été montré que la consommation de ces fourrages par des petits ruminants pouvait contribuer à « freiner » la dynamique des infestations. Pour résumer, deux effets principaux expliqueraient ce constat global : i) une réduction de la contamination du pâturage liée à une moindre excrétion d'œufs de parasites résultant probablement de perturbations de la reproduction des vers ; ii) un moindre succès d'infestation des hôtes en empêchant une bonne installation des larves 3 infestantes. Les

niveaux de réduction observés correspondent aux seuils décrits pour assurer une maîtrise du parasitisme compatible avec la plupart des objectifs de production (KETZIS *et al.*, 2006). De plus, la distribution de ces fourrages a généralement été associée à des effets positifs sur la résilience des animaux (c'est-à-dire leur aptitude à mieux supporter les effets négatifs du parasitisme), ce qui se traduit par une meilleure persistance des paramètres de production ou une atténuation des signes cliniques.

À l'inverse des remèdes de phytothérapie, ces résultats ne reposent pas sur une administration ponctuelle, individualisée, d'extraits de plantes mais supposent une consommation prolongée des ressources riches en tannins. On parle de concept d'« alicament » ou de « nutricament », ces fourrages étant exploités à la fois pour leurs propriétés nutritionnelles mais aussi pour des motifs liés à l'amélioration de la santé des animaux.

Ces effets favorables contre les vers et pour l'hôte ont été observés chez les ovins, caprins et cervidés sous diverses latitudes. Ils ont été constatés avec **des légumineuses fourragères exploitées en vert, mais aussi sous forme conservée** (foin, ensilage) ou même **sous forme de bouchons déshydratés** (OJEDA-ROBERTOS *et al.*, 2010). Une filière de développement de bouchons de sainfoin est d'ailleurs actuellement en train d'émerger en France (FOUCHER, 2011). Pour les légumineuses citées, le rôle des **tannins condensés**, communs à tous ces fourrages, a été largement étayé comme composé phytochimique majeur responsable des activités antiparasitaires mesurées (ROCHFORD *et al.*, 2008 ; MUELLER-HARVEY, 2006). Toutefois, il importe de souligner que :

- les résultats obtenus sur les populations de nématodes ne correspondent jamais à une élimination complète des populations de vers mais à une modulation de leur biologie ;

- la plupart des données indiquent que les effets sont transitoires. Lorsque la distribution de fourrage riche en tannin est interrompue, les vers semblent recouvrer une biologie normale ;

- à l'inverse des formulations de molécules AHs chimiques de synthèse très standardisées, les résultats actuels sur l'exploitation de plantes riches en tannins se caractérisent aussi par une variabilité d'efficacité qui paraît dépendre i) des espèces parasites présentes, ii) peut être de l'animal hôte parasité mais surtout iii) de la quantité et de la nature des substances naturelles actives (tannins, flavonoïdes) présentes dans les plantes.

En conclusion, il faut souligner que **ces études restent du domaine de la Recherche et du Développement**. Il reste de multiples questions auxquelles il faut apporter des réponses pour améliorer et standardiser les effets liés à l'exploitation de ces alicaments avant d'envisager des applications pertinentes en élevage. Ces questions en suspens sont à la fois fondamentales (Quels sont les mécanismes d'action des tannins et composés associés sur les Nématodes gastro-intestinaux ? : quels sont les composés actifs ? à quelles doses ? quels sont les effets attendus selon les espèces parasites en cause ?

quelle est leur destinée le long du tractus digestif ?) et appliquées (À l'échelle des systèmes d'élevage, comment exploiter au mieux ces ressources ? : pendant combien de temps faut-il distribuer ces fourrages ? sous quelle forme ? à quelle fréquence ? est-il possible de développer des méthodes simples et peu coûteuses de mesure des composés naturels actifs ?).

Lorsque les réponses auront été apportées à ces multiples interrogations, il est envisageable, compte tenu de la très large distribution géographique des nématodes et des plantes riches en tannins, que cette démarche générique conduite à identifier des ressources multiples exploitables dans une grande diversité de systèmes d'élevage caprin (fourragers, méditerranéens et pastoraux en région tempérée, mais aussi en zone tropicale) de manière à réduire la dépendance aux anthelminthiques chimiques.

• Améliorer la réponse des chèvres face aux SGIs

Par comparaison aux ovins ou aux bovins, les déficiences avérées des chèvres, et surtout des chèvres laitières, pour développer une réponse solide et persistante vis-à-vis des SGIs font que les connaissances pour proposer des solutions alternatives reposant sur ce principe, au travers de vaccins, de sélection génétique ou d'amélioration de la complémentation, restent aléatoires (HOSTE *et al.*, 2008).

Actuellement, il n'existe pas de vaccins contre les helminthes pour les petits ruminants. Un vaccin contre *Haemonchus contortus*, une espèce de nématode digestif hématophage et donc particulièrement pathogène, est en phase de développement (LE JAMBRE *et al.*, 2008 ; KNOX, 2011). Sa commercialisation semble proche mais son extension à l'espèce caprine se heurte à deux écueils : i) l'étroitesse du créneau commercial et ii) la mauvaise réponse immunitaire des chèvres face aux strongles. Ce dernier point laisse craindre qu'un vaccin potentiel se révélerait moins efficace chez les chèvres malgré quelques données expérimentales plutôt favorables (OLCOTT *et al.*, 2007).

Des programmes de sélection génétique pour des traits fonctionnels de résistance aux infestations par les SGIs existent chez les caprins, mais ils sont beaucoup moins nombreux que chez les ovins (DE LA CHEVROTIÈRE *et al.*, 2011). De plus, ils ont porté essentiellement sur des caprins élevés en zone tropicale pour la viande (BAMBOU *et al.*, 2009) ou chez des chèvres Cachemire à fibre (VAGENAS *et al.*, 2002). En ce domaine, les informations sur les chèvres laitières restent très limitées.

Dans ce domaine de l'amélioration de la réponse de l'hôte face aux vers, **le meilleur « levier technique »** disponible et potentiellement applicable en élevage **reste celui de la complémentation azotée ciblée aux animaux les plus sensibles au sein d'un troupeau**.

Chez les moutons, de multiples études ont montré qu'une augmentation de la composante protéique de la ration permettait d'apporter aux animaux les ressources nutritionnelles nécessaires pour, d'une part, réparer les

lésions dues aux vers et limiter leurs conséquences fonctionnelles et, d'autre part, améliorer les défenses face à ces parasites (COOP et KYRIAZAKIS, 1999). Ce type d'études est beaucoup plus rare chez les chèvres. Quelques données sur chèvres laitières ont montré que les bénéfices positifs d'une telle complémentation « d'adaptation au parasitisme » étaient corrélés aux stress physiologiques de production : les réponses étaient plus nettes chez les meilleures laitières d'un troupeau et en début de lactation, lors d'un fort niveau de production (ETTER *et al.*, 2000). Malgré le nombre élevé de travaux sur les interactions entre complémentation protéique de la ration et réponse de l'animal aux infestations par les SGIs qui ont abondamment étayé la preuve du concept, les applications pratiques en élevage caprin demeurent limitées. Les explications tiennent à deux raisons majeures :

- la difficulté de mesurer avec précision les déficits nutritionnels induits par les vers et donc d'ajuster les complémentations nécessaires. Exprimé autrement, il n'existe pas de tables de nutrition qui prennent en compte toutes les perturbations provoquées par la présence subclinique de parasites ;

- les bénéfices économiques d'une complémentation bien ajustée chez des troupeaux infestés seront d'autant plus nets que des ressources locales ou de faible coût seront utilisables. Toutefois, les fluctuations récentes du marché rendent ces complémentations en protéines souvent presque aussi chères que des traitements chimiques.

• Gérer le pâturage : réduire le risque de rencontre entre chèvres et parasites en prenant en compte les particularités de comportement des caprins

Un des moyens les plus efficaces pour modérer le parasitisme par les SGIs chez les caprins est de leur offrir la **possibilité d'exprimer leur comportement naturel de « cueilleur » et d'exploiter leur stratégie d'évitement des éléments parasitaires infestants**. L'incorporation dans les systèmes de séquences de pâturage de landes, sous-bois ou garrigues présente plusieurs avantages : ces systèmes d'exploitation sont souvent synonymes de moindre chargement et ils offrent aux chèvres des ressources à faible risque car si les larves 3 « *grimpent sur les herbes, elles ne grimpent pas aux arbres et arbustes* ». Enfin, l'hypothèse que certaines des plantes consommées recèlent des substances naturelles dotées de propriétés anthelminthiques a été confirmée à de multiples reprises par des tests *in vitro* ou sur animaux dans le cas de plantes tempérées (PAOLINI *et al.*, 2004 ; BAHUAUD *et al.*, 2005) ou méditerranéennes (MANOLARAKI *et al.*, 2010). Dans la plupart des exemples cités, il est suspecté que des composés tanniques ou des métabolites proches sont responsables des effets AHs constatés (HOSTE *et al.*, 2006).

En situation de pâturage herbacé strict, compte tenu de la faible propension des chèvres à se défendre naturellement face aux SGIs, le meilleur moyen usuel de réduire l'intensité des infestations passe bien évidemment par l'emploi stratégique ou tactique de traitements

chimiques AHs. Mais les limites actuelles de cette chimiothérapie ont été énumérées précédemment.

En l'absence de tels traitements ou en raison de leur inefficacité, **une autre option de bon sens consiste à réduire le chargement par hectare** mais une telle mesure est souvent difficile d'application en élevage pour des raisons économiques et de gestion prioritaire de la nutrition immédiate et de la constitution de réserves fourragères. Pour essayer d'ajuster la conduite du pâturage à chaque ferme, des modèles d'analyse des systèmes ont été développés et sont en voie d'adaptation et d'amélioration à l'aide de logiciels informatiques pour fournir à chaque **élevage** un outil personnalisé permettant de mieux identifier les périodes (quand ?) et les zones (où ?) à risque (NAPOLEONE *et al.*, 2011), puis d'explorer, dans le cadre d'une démarche interactive, les solutions ou modifications éventuelles à implanter.

Tout comme pour les ovins, les potentialités de décontamination / désinfection des prairies par des pratiques de pâturage mixte, simultanée ou alternée entre bovins et petits ruminants, et de limitation des risques cliniques ou économiques associés restent réelles lorsque les systèmes d'élevages le permettent (HOSTE *et al.*, 2003 ; DOUMENC, 2003).

Conclusion

Les diverses contraintes rencontrées dans la gestion du parasitisme par les strongles digestifs chez les chèvres (forte sensibilité des animaux de tout âge aux infestations, restriction des traitements en raison d'une part de la production de lait et d'autre part de l'importance des résistances aux AHs chez les vers) créent une situation complexe face à laquelle une gestion exclusive par des moyens thérapeutiques n'est plus suffisante. Gérer des interactions complexes par des solutions simples est illusoire. Les élevages caprins au pâturage sont probablement les premiers où vont devoir s'appliquer les connaissances accumulées pour appliquer une gestion intégrée, s'appuyant sur la combinaison de plusieurs méthodes de lutte, répondant aux divers principes énoncés et prenant en compte les particularités des chèvres afin de réduire les impacts économiques dus aux SGIs. En un sens, l'élevage caprin a ainsi valeur de modèle, pour apprendre à gérer les SGIs avec un recours minimal aux traitements chimiques car des contraintes similaires sont en train d'émerger en élevages ovin et bovin et risquent d'aller croissantes.

Accepté pour publication,
le 19 octobre 2012.

Remerciements pour les aides apportées par l'Action COST FA 0805 CAPARA (« Goat-parasite Interactions: from knowledge to control »), par le Projet 12050599 de la Région Midi-Pyrénées « Maîtrise améliorée du parasitisme par les strongles gastro-intestinaux chez les ovins et les caprins » et par le projet CASDAR « Développement et évaluation de stratégies et d'outils pour optimiser l'usage des anthelminthiques dans la maîtrise des strongyloses gastro-intestinales en élevage de ruminants ».

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBERTI E.G., ZANZANI S.A., FERRARI N., BRUNI G., MANFREDI M.T. (2012) : "Effects of gastrointestinal nematodes on milk productivity in three dairy goat breeds", *Small Ruminant Res.*, 165, 512-517.
- BAHUAUD D., MARTINEZ-ORTIZ DE MONTELLANO C., CHAUVEAU S., PREVOT F., TORRES ACOSTA, J.F.J., FOURASTE I., HOSTE H. (2005) : "Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes", *Parasitology*, 132, 545-554.
- BAMBOU J.C., ARQUET R., ARCHIMEDE H., ALEXANDRE G., MANDONNET N., GONZALEZ-GARCIA E. (2009) : "Intake and digestibility of naive kids differing in genetic resistance and experimentally parasitized (indoors) with *Haemonchus contortus* in two successive challenges", *J. of Animal Sci.*, 87, 2367-2375.
- BARNES E.H., DOBSON R.J., BARGER I.A. (1995) : "Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model", *Parasitology Today*, 11, 56-63.
- BEUGNET F., KERBOEUF D. (1997) : "La résistance aux antiparasitaires chez les parasites des ruminants", *Le Point Vétérinaire*, n° spécial *Parasitologie des ruminants*, 28, 167-174.
- CABARET J. (2012) : "Résistance des strongles aux anthelminthiques chez les ruminants", *Le Point vétérinaire*, n° spécial *Parasitologie interne des ruminants*, 43, 8-13.
- CHARTIER C. (2010) : "Parasitisme helminthique des caprins", *Pathologie caprine : du diagnostic à la prévention*, Wolters Kluwer France Rueil Malmaison, pp 159-179.
- CHARTIER C., RECHE B. (1992) : "Gastrointestinal helminths and lungworms of French dairy goats: prevalence and geographical distribution in Poitou Charentes", *Veterinary Res. Communications*, 16, 327-335.
- CHARTIER C., HOSTE H. (1997) : "La thérapeutique anthelminthique chez les caprins", *Le Point Vétérinaire*, 28, 125-132.
- CHARTIER C., SOUBIRAC F., PORS I., SILVESTRE A., HUBERT J., COUQUET C., CABARET J. (2001) : "Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of dairy goats under extensive management conditions in south western France", *J. of Helminthology*, 75, 325-330.
- COOP R.L., KYRIAZAKIS I. (1999) : "Nutrition-parasite interaction", *Veterinary Parasitology*, 84, 187-204.
- DE LA CHEVROTIÈRE C., MORENO C., JAQUIET P., MANDONNET N. (2011) : "La sélection génétique pour la maîtrise des strongyloses gastro-intestinales des petits ruminants", *Productions Animales*, 24, 221-234.
- DOUMENC V. (2003) : *Helminthofaune des caprins en Saône et Loire : Influence du pâturage mixte avec les bovins*, Thèse de Doctorat Vétérinaire, Toulouse, 99 p.
- ETTER E., HOSTE H., CHARTIER C., PORS I., KOCH C., BROQUA C., COUTINEAU H. (2000) : "The effect of two levels of dietary protein on resistance and resilience of dairy goats experimentally infected with *Trichostrongylus colubriformis*: comparison between high and low producers", *Veterinary Res.*, 31, 247-258.
- EUROPA (2011) : http://ec.europa.eu/agriculture/statistics/agricultural/2011/pdf/d17-0-417_en.pdf
- FOUCHER F. (2011) : "La renaissance du sainfoin : du fourrage au granulé déshydraté", *La Revue de l'Alimentation Animale*, 649.
- FRESNAY E. (2004) : "Exemples de mise en oeuvre de la "cascade" dans le traitement des parasitoses chez les ruminants laitiers", *Bulletin GTV*, Hors série *Parasitologie des ruminants laitiers*, 140-144.
- GALTIER P., ESCOULA L., CANGUILHEM R., ALVINERIE M. (1981) : "Comparative bioavailability of levamisole in non lactating ewes and goats", *Annales de Rech. Vétérinaire*, 12, 109-115.
- HENNESSY D., SANGSTER N.C., STEEL J.W., COLLINS G.H. (1993) : "Comparative pharmacokinetic behaviour of albendazole in sheep and goats", *Int. J. for Parasitology*, 23, 321-325.
- HOSTE H., CHARTIER C. (1993) : "Comparison of the effects on milk production of concurrent infection with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in high- and low-producing dairy goats", *American J. Veterinary Res.*, 54, 1886-1893.
- HOSTE H., CHARTIER C. (1998) : "Résistance des chèvres aux strongyloses gastrointestinales : différences avec les moutons", *Le Point Vétérinaire*, 29, 69-74.
- HOSTE H., CHARTIER C., ETTER E., GOUDEAU C., SOUBIRAC F., LEFRILEUX Y. (2000) : "A questionnaire survey on the use of anthelmintics in dairy goats in France", *Veterinary Res. Communications*, 24, 459-469.
- HOSTE H., LEFRILEUX Y., POMMARET A. (2002A) : "Comparison of selective and systematic treatments to control nematode infection of the digestive tract in dairy goats", *Veterinary Parasitology*, 106, 345-355.
- HOSTE H., CHARTIER C., LEFRILEUX Y. (2002B) : "Control of gastrointestinal parasitism with nematodes in dairy goats by treating the host category at risk", *Veterinary Res.*, 33, 531-545.
- HOSTE H., GUITARD J.P., PONS J.C. (2003) : "Pâturage mixte entre ovins et bovins : intérêt dans le gestion des strongyloses gastro intestinales", *Fourrages*, 176, 425-436.
- HOSTE H., JACKSON F., ATHANASIADOU S., THAMSBORG S.M., HOSKIN S.O. (2006) : "The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants", *Trends in Parasitology*, 32, 253-261.
- HOSTE H., TORRES ACOSTA J.F.J., AGUILAR CABALLERO A.J. (2008) : "Parasite interactions in goats: is immunoregulation involved in the control of gastrointestinal nematodes ?", *Parasite Immunology*, 30, 79-88.
- HOSTE H., SOTIRAKI S., LANDAU S.Y., JACKSON F., BEVERIDGE I. (2010) : "Goat nematode interactions: think differently !", *Trends in Parasitology*, 26, 376-381.
- KAMINSKY R., GAUVRY N., SCHORDERET WEBER S., SKRIPSKY T., BOUVIER J., WENGER A., SCHROEDER F., DESAULES Y., HOTZ R., GOEBEL T., HOSKING, C.B., PAUTRAT F., WIELAND-BERGHUSEN S., DUCRAY P. (2008) : "Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate", *Parasitology Res.*, 103, 931-939.
- KENYON F., GREER A.W., COLES G.C., CRINGOLI, G., PAPADOPOULOS, E., CABARET, J., BERRAG, B., VARADY M., VAN WYK J., THOMAS E., VERCROYSE J., JACKSON F. (2009) : "The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants", *Veterinary Parasitology*, 164, 3-11.
- KETZIS J.K., VERCROYSE J., STROMBERG B.E., LARSEN M., ATHANASIADOU S., HOUDIK J.G. (2006) : "Evaluation of efficacy expectations for novel and non chemical helminth control strategies in ruminants", *Veterinary Parasitology*, 139, 4, 321-335.
- KNOX D. (2011) : "Proteases in blood-feeding nematodes and their potential as vaccine candidates", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 712, 155-176.
- LEFRILEUX Y., MORAND-FEHR P., POMMARET A. (2008) : "Capacity of high milk yielding goats for utilizing cultivated pasture", *Small Ruminant Res.*, 77, 113-126.
- LEFRILEUX Y., POMMARET A., MORAND-FEHR P., LEGARTO J. (2012) : "Utilisation des prairies par les chèvres laitières dans les conditions du sud-est de la France", *Fourrages*, 212, 279-288.
- LE JAMBRE L.F., WINDON R.G., SMITH W.D. (2008) : "Vaccination against *Haemonchus contortus*: Performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture", *Veterinary Parasitology*, 153, 302-312.
- LESPINE A., CHARTIER C., HOSTE H., ALVINERIE M. (2012) : "Endectocides in goats: Pharmacology, efficacy and use conditions in the context of anthelmintic resistance", *Small Ruminant Res.*, 103, 12-17.

- MANOLARAKI F., SOTIRAKI S., SKAMPARDONIS V., VOLANIS M., STEFANAKIS A., HOSTE H. (2010) : "Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes", *Parasitology*, 137, 685-696.
- MUELLER-HARVEY I. (2006) : "Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health", *J. Science Food and Agriculture*, 86, 2010-2037.
- NAPOLEONE M., HOSTE H., LEFRILEUX Y. (2011) : "The use of grazing pastures in goat production: development of an approach to combine optimized use of the forage resource and the control of related risks", Bouche R., Derkimba A., Casabianca F. eds., *New Trends for Innovation in the Mediterranean Animal Production*, vol. 129, EAAP Publication, 307-316.
- NGUYEN V.K., JACQUIET P., DURANTON C., BERGEAUD J. P., PREVOT F., DORCHIES P. (1999) : "Réactions cellulaires des muqueuses nasales et sinusales des chèvres et des moutons à l'infestation naturelle par *Oestrus ovis* Linné 1758 (Diptera : Oestridés)", *Parasite*, 6, 141-149.
- OJEDA-ROBERTOS N., MANOLARAKI F., THEODORIDOU K., AUFRERE J., HALBWIRTH H., STICH K., REGOS I., TREUTTER D., MUELLER-HARVEY I., HOSTE H. (2010) : "The anthelmintic effect of sainfoin (silage, hay, fresh) and the role of flavonoid glycosides", *EAAP meeting*, Heraclion, Creta Island, 20-24th August 2010.
- OLCOTT D.D., WEEKS B.M., SHAKYA K., SMITH W.D., MILLER J.E. (2007) : "Effect of vaccination of goats with H-11/H-gal-GP antigens from intestinal membrane cells of *Haemonchus contortus*", *J. of Animal Sci.*, 65, Suppl 2, 35.
- PAOLINI V., FOURASTE I., HOSTE H. (2004) : "*In vitro* effects of three woody plant and sainfoin on third-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes", *Parasitology*, 129, 69-77.
- PARAUD C., FOURNIER E., ROBERGEOT V., KULO A., PORS I., BAUDRY C., CHARTIER C. (2009) : "*Calicophoron daubneyi* infection in grazing goats: Results from a cross-sectional coprological survey in France", *Small Ruminant Res.*, 82, 66-68.
- PARAUD C., PORS I., REHBY L., CHARTIER C. (2010) : "Absence of ivermectin resistance in a survey on dairy goat nematodes in France", *Parasitology Res.*, 106, 1475-1479.
- RINALDI L., CRINGOLI G. (2012) : "Parasitological and pathophysiological methods for selective application of anthelmintic treatments in goats", *Small Ruminant Res.*, 103, 18-22.
- ROCHFORD S., PARKER A.J., DUNSHEA F.R. (2008) : "Plants for ruminant health and productivity", *Phytochemistry*, 69, 299-322.
- TORRES-ACOSTA J.F.J., HOSTE H. (2008) : "Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing / browsing sheep and goats", *Small Ruminant Res.*, 77, 159-173.
- VAGENAS D., JACKSON F., MERCHANT M., WRIGHT I.A., BISHOP S.C. (2002) : "Genetic control of resistance to gastro-intestinal parasites in crossbred cashmere-producing goats: responses to selection, genetic parameters and relationships with production traits", *Animal Science*, 74, 199-208.

DISCUSIÓN GENERAL

GENERAL DISCUSSION

The main objective of this current dissertation was to evaluate the effects of Tannin Rich Plants (TRPs) and resources on the gastrointestinal nematodes community in small ruminants, under the hypothesis of a direct effect. In this way, we pretended to discern effects on adult worm population associated to structural and functional changes (Chapter 1). This phenomenon was also studied under experimental and controlled conditions “indoor” and in convectional husbandry farming system (Chapter 2). To support the hypothesis of the anthelmintic effects of tannin rich plants, we included in the annex a review about the interaction between small ruminants and nutrition in the modulation of GIN infestation (Article 5). We go into detail of the particularities of caprines as host, due to their particular nutritional behavior and sensibility to nematodes infection (Article 6).

The experiences were mostly developed *in vivo* and focused on the adult worm population, in two different hosts: goats and sheep. In terms of variables we have considered: Direct effects observed on worms, effects on host resilience, measured under controlled condition in an experimental infestation and in a convectional production system. Lastly we give an overviewed about small ruminants-nutrition and parasites interaction:

- *In vivo* experiences against Adult worm population
- Observing direct effect on Worms (Chapter 1, Articles 1 and 2)
- Observing effects under controlled conditions (Chapter 2, Article 3 and 4).
- Small ruminant nutrition and helminthic infection interactions (Annex: Article 5), and goats as host (Annex: Article 6).

***In vivo* experiences**

The experiences were performed *in vivo* in order to confirm previous *in vitro* screening validations. Multiple factors were also considered such as: host, GIN species and type of tanniniferous resources tested, among them (Hoste et al., 2011). Our proposal was to increase the information about the temperate forages sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), carob pods (*Ceratonia siliqua*) and the tropical tree Tzalam (*Lysiloma latisiliquum*). Until now, different assays carried out, have discerned some effects on L3 exsheathment and larvae establishment (Paolini et al., 2003b; Lange et al., 2006; Brunet et al., 2008b), egg excretion (Lange et al., 2006; Terrill et al., 2009; Manolaraki et al., 2010), number of adult worms (Heckendorn et al., 2006; Lange et al., 2006; Shaik et al., 2006; Heckendorn et al., 2007), or female fertility reduction (Paolini et al., 2005a; Manolaraki et al., 2010; Martínez-Ortíz-De-Montellano et al., 2010). Even though, the lack of information about the particular effects and mode of action on adult worm population needs to be completed. For this reason, our trials were then focused on adult parasitic stages, aiming to add a complementary information but also, to increase the knowledge about the AH effects of carob pods (Manolaraki et al., 2010), sainfoin hay (Paolini et al., 2004; Paolini et al., 2005a; Paolini et al., 2005b; Heckendorn et al., 2006) and tzalam (Martínez-Ortíz-De-Montellano et al., 2010). Gastrointestinal worms arises to adult stage within the hosts, that's one of the limitations in the understanding on the AH mode of action. How the CTs interact with worms inside the hosts, and how these interactions can contribute to the modulation of the infection, remains unclear. For this reason, we consider that one of the benefits of *in vivo* trials is the possibility of reproducing real field conditions while

controlling the parasitic dosage. Along the trials, the animals received the specific recommended dose ratio of multiple and compatible worm species or just a monospecific infection, following Wood et al 1995 recommendations. Despite of the benefits of *in vivo* trials, it is also necessary to consider that more difficulties are expected than *in vitro*, where most of the variables are commonly under control. A clear example of those difficulties was the evaluation of inorganic phosphorus values in Article 4, where values seemed to reflect problems with the serum samples, not with the assay per se. For this reason, *in vivo* assays require to consider the effects of animal behavior, particular physiological conditions within the host, farm management and/or non predictable elements or adversities.

Direct effects observed on adult worm population

Structural changes of worms

Alterations in worms structure is considered one of the factor that modulates the AH effects observed of tanniniferous resources (Hoste et al., 2006). This aspect is confirmed in a recent published paper, about changes in L3 larvae of *H. contortus* and *T. colubriformis* in contact with sainfoin extracts *in vitro* (Brunet et al., 2011). This previous information and the lack of an important amount of information about structural changes on adult worms *in vivo*, aimed us to propose this trial: *in vivo* and *in vitro* (Article 1). The *in vitro* assay followed by SEM observations, gave us a previous clues about the mechanism of action of Tzalam and sainfoin extracts, to develop our *in vivo* assay. *Haemonchus contortus* was the selected GIN, to be analyzed. Damages were observed in adult worms' population. Those effects are generally associated to the linkage of tannins to proteins as proline and hydroxyproline from cuticle, generally distributed along body, buccal cavity, esophagus, cloaca and vulva (Thompson and Geary, 1995). These tannin-protein binds, are also thought to be responsible of changes on fertility of females and egg excretion (Niezen et al., 1995; Niezen et al., 1998a; Athanasiadou et al., 2001; Paolini et al., 2003b; Brunet et al., 2008b; Martínez-Ortíz de Montellano et al., 2009). As we saw, the main alterations corresponded to cuticular damages and aggregates. Differences between assays were basically found on alterations on female reproductive system *in vitro* but not *in vivo*. Also, a different kind of modifications seemed to be induced by each plant type extracts, *in vivo* or *in vitro*. Structural changes observed in synlophe, could be associated then, to alterations on worms motility. The presence of aggregates found around the anterior part of the digestive tract (i.e. buccal capsule), might eventually lead to worm undernourishment, reduced fertility and/or mortality. Only under *in vitro* conditions the reproduction functions seems to be affected. Even though, considering the results about egg excretion decrease obtained through different assays, we might expect that those changes happens also *in vivo* (Martínez-Ortíz-De-Montellano *et al.*, 2010), even if our results do not conclude it apparently. In any case, the *in vitro* results were obtained in a short period of time at the maximum concentration, but in real field condition, the exposure within the gastrointestinal tract must be less high, for this reason we propose to also measure it *in vivo*, were the worms will be in contact in a physiological level, lower than *in vitro*.

Functional changes

The experience with the self-fertilized female *C. elegans* (Article 2) was designed in order to establish the basis of a model to evaluate the effects of some purified monomers, on egg lying and egg hatching behavior. The effect of time, monomer and time-monomer interaction was also taken into account. The selection of a solid Nematode Growth Medium (NGM) was the best option for our aims and the possibility of screening the AH effectiveness of polyphenols. Nor lethal effects on worms neither bagging (hatching of the progeny inside the parent worms) (Bull *et al.*, 2007) were observed through our trials. When analyzing the possible alterations on egg-lying ratio, the effect of time appeared to be most significant factor within subjects through the assays. Based on that, we can justify it as an effect of worm phenology and senescence (Hart, 2006) and obviously not to the treatment per se. The effect of monomer concentration in the decrease of the fertility of worms was for the flavan-3-ol Catechin at the maximum concentration (20 μ M) compared to control plates. In terms of development (egg-hatching), a wide variability of results was observed depending on each assay and monomer concentration. Statistically, the effect of time on percentages egg hatched was also found significant for the whole assays, but in case of Catechin and Epigallocatechin Gallate, so an effect of these monomers might be associated in the egg- hatching through time. The effect of the interaction of the variable "time" and monomer was found statistically significant for the Hydrolysable Tannins, Gallic and Tannic acid as well as for the second assay with Flavone. Between subjects, statistical analyses were significant for the flavonols Quercetin and Rutin showing a general decrease on the percentage of development, as well as for Genistein and Flavone. Nevertheless significant results were found for Genistein 20 micro molar, responsible of a light increase of percentage hatching respect to control. None of the percentages of reduction for egg-lying or/and egg-hatching were higher than 30%, so we cannot assume a consistent effect in any of the assays. In some cases these percentages were associated to an increase in the egg-laying ratio or egg hatching, more evident in case of the flavan-3-ols Catechin and Epigallocatechin gallate on egg-hatching. Previous results from the anthelmintic effects of different monomers of condensed tannins on GINs had confirmed a relationship between structure and activity, showing that prodelphinidin and galloyl-derivatives were more effective than the procyanidin monomers (Brunet and Hoste, 2006; Brunet *et al.*, 2008), and suggesting the important role of the free hydroxyl groups of CT monomers in the monomers-GINs interactions. Based on these features, we included in our trial the flavan-3-ols Catechin and Epigallocatechin Gallate, also because of it is already-know AH activity (Molan *et al.*, 2003, 2004). Catechin belongs to procyanidins the principal units of CTs (Mueller-Harvey, 2006), while Epigallocatechin-gallate, results from the addition phenolic compounds and Gallic acids (Hagerman, 2002a) that confers them different properties as in protein binding (Aerts *et al.*, 1999; Mueller-Harvey, 2006). Both are associated with an AH activity in egg- hatching GINs but not completely (Molan *et al.*; 2003), being the galloyl the most effective in terms of AH properties (Molan *et al.*, 2003, Brunet and Hoste 2006). In our case, both showed an effect in the decrease of egg lying but an increase on percentages of development, independently to their concentration, even though none of the percentages were higher than 30%, being, the only statistical significant data for Catechin 20 μ M, in the fertility decrease. In this case flavanols, showed a negative correlation for fertility and development in a

Moderate level. So the decrease in worms' fertility and the increase in percentages of development, depending on monomer concentration would explain the 46.8% of the cases. Other studies with EGCG, that showed an effective antioxidant properties in lifespan and aging associated to their antioxidant properties against *C. elegans* (Brown, et al., 2006; Zhang et al., 2009) as happened in case of some flavonoids and the benefits on thermotolerance and oxidative stress (Kampkötter et al., 2007). Quercetin was associated to the prolongation of *C. elegans* lifespan and the resistance to oxidative stress increased, as well as to scavenger activity against free oxygen radicals (Kampkötter et al., 2008; Pietsch et al., 2009). The toxicity of gallo and condensed tannins on *C. elegans* behavior, declining pharyngeal pumping or modifying life span, has been already reported to have a high dependency on molecular sizes, conditioning the activity-structure relationship (Yamasaki et al., 2002). In case of the Dihydrochalcones nor Phloretin neither Phloridzin (a Phloretin derivate attached to a glucosidic group) (Gosch, 2010), were found to have any specific activity against *C. elegans*' fertility and development. In case of the Hydrolysable tannin (HTs), Tannic acid, showed effectiveness against egg-hatching and a very good negative correlation of egg-hatching and egg-lying, that would explain the relative decrease on egg-lying behavior as the egg-hatching seems to increase. In the same way, other authors have reported an inhibition on the reproduction and motility of *C. elegans* after the contact to a mixture of HTs from *Quercus petraea* bark (Katiki et al., 2012), as well as effects on life-span prolongation after the exposure to a low concentration to tannic acid (TA) (Saul et al., 2010). A moderate effectiveness for the Flavone and Isoflavones was also noticed. After this experience in general terms, we consider that *C. elegans* grown in a solid NGM allows us to establish the basis of a protocol to evaluate the main effects on functional activities, such as egg-lying behavior and egg-hatching. The exposure of *C. elegans* to our monomers in our experimental design, did not seem to highly alter egg-lying, contrary, egg-hatching might be affected, showing and increased or decreased in the incoming of second generation. Even though, difficulties on data analysis, were associated to the low number of replications, so more replications are needed to obtain a wide results data file with a powerful statistical results, that will require also a better and higher level of organization to in terms of handling. Even though, this assay pretended to be the first step to create a protocol to measure in adult stages the effect of different polyphenols on functional activities, difficult to be measure in vivo, in case of the parasitic species. For this reason we consider that our aim was well-done.

Observing effects under controlled conditions

Our assays were developed in a traditional farming system (Article 3) and under experimental indoor conditions (Articles 4). Animals received an induced L3 experimental infection. The incorporation of the experimental conditions within this PhD, gave us the challenge to better understand the variability of results depending on animals management and breeding. Even considering that advances in convectional farming, have successfully increase animals performance, decreasing production costs (Sundrum, 2001), it is also worthy to notice the raise of friendly environmental and sustainable production systems demands. The inclusion of phytotherapeutic remedies against worms' diseases is also considered in conventional systems. Nevertheless consistent information about the tannin rich plant

dosage, polyphenols concentration depending on plant parts or plant extracts, is still needed. We have taken into account the potential AH effects of some tannin rich extracts, already screened from temperate and tropical plants, such as sainfoin hay, carob pods and Tzalam leaves (see review by Hoste *et al.*, 2012) for the design of our experiences.

In Chapter 2, (Article 3), we present an assay in a conventional farming system to confirm their AH effectiveness of carob, using sainfoin as a control. Results did not show any significant differences on the pathophysiological measures. No differences were found for body weight gain depending on the diets, even though sainfoin seemed to have positive effects on live weight increase respect to control one. The hematocrite values remained under zoonotic parameters along the groups, so this fact must be associated to the low amount of *H. contortus* recovered at the necropsy rather than indirect effects of tannin rich plants. Serological Phosphate values did not arise any consistent result, probably associated to serum samples alteration, rather than a really restoration of phosphate level, due to the treatments. Parasitological measures, showed a significant decrease on egg per gram of faeces (EPG) for carob and sainfoin groups in conventional farming. It was also found a trend on worm burden decreased for sainfoin experimental group, although this trend was only significant for *T. colubriformis* population. A priori, any significant differences for fertility of females for any of the species or treatment were found. Even though, fertility of *T. colubriformis* for sainfoin group was 44% lower, while for *H. contortus*, values were lower in *C. siliqua* than in *O. viciifolia* fed regime, in a 25.8% and 18% respectively. Our results, seems to confirm previous experiences with sainfoin in sheep and goats egg excretion reduction (Paolini *et al.*, 2003b; Thamsborg *et al.*, 2003) and female fertility, with no worm burden modification (Paolini *et al.*, 2005a; Manolaraki *et al.*, 2010). A priori we can conclude that the AH effects must be analyzed considering worm species location but also depending on the plant tested, due to the differences on the concentration and molecular structure of their active compounds (Molan *et al.*, 2003b) as well as their biological activity (Alonso-Díaz *et al.*, 2010). Indirect effects observed might be associated to the tannin-protein bind, that would protect proteins from ruminal degradation, increasing the availability of protein in ruminant small intestine (Mueller-Harvey and Mc Allan, 1992), encouraging the resilience and resistance of hosts against GINS (Hoste *et al.*, 2006).

In article 4, we observed the contribution of Sainfoin hay (*Onobrychis viciifolia*) to the modulation of Trichostrongylos. The main objectives of this trial were to measure the direct and or indirect effects of two different sources of tannins Sainfoin (S) and Quebracho extract (Q), depending also on the length of distribution. We pretended to better understand the AH effectiveness in the improvement of resilience or resistance of host to GINS infection (Hoste *et al.*, 2006). Until now, the majority of this type of assays have been focused in different GINS' larval stages in small ruminants, so in our case, we pretended to elucidate these effects on the gastrointestinal adult worm population in *H. contortus* and *T. colubriformis*. We evaluated the pathophysiological effects in hosts, but also the parasitological and post-mortem parameters. To increase the consistence of our data, histological samples were also taken to measure the cellular infiltration.

The cellular response of the hosts changed when supplemented with tannin rich materials. Independently of the location of the tissues, fundus, pylorus or small intestine, no significant differences

were found between the three experimental groups for the mast cell number. Significant differences were found for eosinophils in the pylorus, with higher values in the S group compared to the Q and Control (C) groups. The most consistent statistical differences were found for the mucosal Globule leukocytes (GL) numbers. Significant differences according to the treatment were found for the fundic and the intestinal Globule leukocytes values. Lower values in the C group compared to the S and particularly the Q group. However, no significant differences were found between the groups for the number of GL in the pylorus. The present experimental design failed to prove any long term effect of tannins on inflammatory response of lambs. It could be necessary to test longer periods of tannin supplementation compared to controls to accept or discard any possible effect of tannins on the immune response. The evaluation of Body Gain rate, did not show evidences of increase associated to tannin-rich resources consume or to the effect of time. Quebracho extract is a good condensed tannins commercial source, but the dosage during the trial, was not adjusted to the rate of growth of the experimental lambs. So a progressive readjustment of Quebracho dosage to each individual live weight rate might be done, for a better AH effectiveness. In case of Sainfoin the administration was *ad libitum*, implying that host would have consumed the amount of Sainfoin depending on their progressive increase of live weight and needs through the time. Even though, the lack of significant results might be explained after the evaluation on polyphenol content with a low percentages in contrast to Quebracho extract. Sainfoin, showed a 12% of Total Phenols (TPs), 5.24% for Total Tannins (TTs) and 3.12% for Condensed Tannins (CTs) content lower to those found in Quebracho extract. These low polyphenol concentration, could be probably associated to our particular Sainfoin strain or to the particular geographic region of growth, where Sainfoin might not produce a large amounts of polyphenols (Manolaraki et al., 2010). Even though, the evaluation of the Bioactivity (Hoste et al., 2010; Alonso-Díaz et al., 2010ab; Hoste et al., 2012) would complete this information. In terms of hematocrite values, a progressive decrease on the PCV levels was observed after the infection, associated to the loss of blood and plasmatic proteins caused by *H. contortus* infection as hematophagous GINs (Parkins and Holmes 1989; Holmes 1993). After the first necropsy, an increase in the PCV values was noticed, but we cannot conclude an effect of the length of distribution. This phenomenon seems to be much more associated to the effect of the animal selection per se, than to the treatment, because for ethical reasons, lambs with lower PVCs values were those selected to be slaughtered the first, corresponding to the Short term group. This decision could have an important statistical effect. Even though, a trend on D42 post-infection for Quebracho, corresponding to the long term treatment was observed. To complete the hematocrite values, a FAMACHA test was also performed. A good correlation was found between FAMACHA results and the percentages of erythrocytes measured on D42. Then, we can also affirm that FAMACHA test is an interesting system to evaluate the degree of anemia in case of infection with the “blood sucker” *H. contortus*. In any case, we can verify the effect of a TRPs or resources exposure in the pathophysiological parameters, so further studies are need to verify the effect of long term exposure.

The analyses of parasitological measures, showed a clear reduction in worm burden for both species (*H. contortus* and *T. colubriformis*) in lambs supplemented with Quebracho extract for a short (QS) and long term (QL) treatment. A reduction in the fertility of *T. colubriformis* fertility but not in *H.*

contortus was also assessed. Meanwhile, Sainfoin did not affect to worm burden, but a reduction in the fecundity of female *H. contortus* happened. These results suggest that differences might be associated to: the mode of action of the source of tannins, other secondary metabolites possible involved, but also due to particularities of each worm species (Paolini, et al., 2005b; Athanasiadou et al. 2007) as nutrition (Linklater and Smith, 1993; Hansen and Perry, 1994), and the chemical characteristics of the nematode's cuticle (Fetterer and Rhoads, 1993; Page, 2001). Based in previous reports, we evaluated the effect on the egg excretion; no consistent findings were measured in this trial, only in case of Sainfoin. The reported decrease in the number of Worms for *T. colubriformis* and *H. contortus*, confirming previous reports about the higher susceptibility of intestinal species respect to abomasal ones, in lambs treated with Quebracho extract (Mangan, 1988; Athanasiadou et al., 2000b, Coop et al., 2001), but we cannot confirm that Sainfoin affect significantly to this variable. Contrary, Sainfoin seems to be more involved in the decrease of the fertility per capita for both species (Paolini et al., 2005a). In summary results obtained in our in vivo experience with lambs seems to confirm the AH effectiveness of tannin rich plant or resource tested and the time of exposure in the decrease of EPG, the fertility of females and the immune response of host to worms. It also seems to be confirmed the participation of Sainfoin in the modulation of trichostrongylos infestations in goats. Differences on the concentration of tannin would explain the differences found *in vitro* associated to source of tannins and GIN specie affected (Paolini et al., 2004) and *in vivo* (Paolini et al., 2003b; Paolini et al., 2005b) allowing us to confirm the hypothesis of a direct relationship of tannin dosage administration and time of exposure against GINs population. Even though new long term assays are needed to confirm the evidences founded in this trial.

Small ruminant nutrition and helminth infection interactions

Within Annex, we can find a compendium of review papers basically focused in two elements to take into account when we look for alternative anthelmintic methods against GINs in small ruminants.

Through Article 5 we analyses the complexity of the multiple interactions between host nutrition and the dynamic of helminthic parasites. The nutritional resources can be associated to favorable effects but also to undesirable ones, as the way of infection or reinfection, or due to their potential toxic effects. The nutritional behavior of host might be then, important in the interaction with the gastro-intestinal strongylos and their modulation. The nutritional facts modulate the interactions with worms through different ways: benefiting host to better face parasitism and its consequences: resistance and/or resilience, decreasing contamination of pastures and reducing the contact with the sources of contamination. The use of Nutraceutical plants (Andlauer and Fürst, 2002) is based on their nutritional benefits but also due to their anthelmintic properties associated to secondary metabolites as Condensed Tannins (Rochfort, et al., 2008). A high number of leguminous rich in CTs have been tested till now: sulla (*Hedysarum coronarium*), Lotus *pedunculatus* and Lotus *corniculatus*, Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), the subtropical *Sericea lespedeza* and *Lespedeza cuneata*, or the tropical *Lysiloma latisiliquum* (see Hoste, et al., 2006; Rochfort, et al., 2008; Novobilsky et al., 2011) fresh, as hay, ensilage or dehydrate. This was also confirmed a posteriori in host as cervids and caprines. The way this polyphenolic compounds interact with host and parasites is not completely understood, that is one of the reason of this PhD, even

though, the consume of forages rich in CTs is highly associated with perturbations on stages of worms life cycle rather than a 100% of anthelmintic effectiveness (Kavaliers et al., 1999). Considering all these results, theoretically a better husbandry practices would contribute to limit parasites infection (Dumont et al., 2001) and taken advantage of the self-medication behavior, the preservation of a higher biodiversity number of plants would contribute to animal welfare (Farrugia et al., 2008), even though studies in the field of nutrition and gastrointestinal nematodes interaction need to be implemented in order to reduce the use of synthetic drugs and the development of resistances among the worms.

In article 6, we offered a reviewed about goats and their particular nutritional behavior in a context of parasitic interaction. Even if goats and lambs share the same GINs' species, the nutritional behavior and the physiological specificities, as well as their sensibility to gastrointestinal nematodes differed, requiring then, to be considered independently. So far, dairy goat farms have made a limited use of pasture for grazing limiting then the probabilities of helminth infestation. Unfortunately goats are highly susceptible to parasitic infections, and more precisely to intestinal helminthes, which tend to increase when goats are grazing outdoors. The identification of risks and the specific response of goats to different types of outdoor parasites are then needed to establish an adequate management. Gastrointestinal Strongyles (helminthes) are the main type of infection taken into consideration owing to their high prevalence in grazing herds and their economic impact. Until now many difficulties have been found in the correct management of gastrointestinal nematodes in goats associated to: their high susceptibility (higher than lambs), the restriction in the application of anthelmintic drugs during lactancy in France and to the development of resistances against AH of worms. This situation creates difficulties in the application of adequate treatments, requiring for an integral treatment (alternating and targeting treatments, drug dose and mode of administration, pasture management, tannin-rich legumes...) avoiding the exclusively relied in chemical drugs, in the control gastro-intestinal strongylosis. Lambs are considered to have a grazer nutritional behavior that would have helped through time for the natural selection of those animals immunologically resistant to GINs. Contrary, goats, mainly browsers allowed to feed in a complex system, they can feed on shrubs and brushwood and avoiding contact with, infective L3, but, highly exposed to different botanical resources with more or less toxic compounds. This would have benefit the way goats get tread of potentially toxics xenobiotics, as their immunological resistance to GINs would be less favored (Hoste et al., 2010). Considering these natural strategies of feeding and physiological adaptations as in goats, the anthelmintic methods susceptible to be applied in each specie would relied in each particular host, as well as the posology of the molecules and/or anthelmintic resources (Chartier and Hoste, 1997; Chartier, 2010). In the development of alternative AH strategies to avoid the spread of AH resistances, is necessary in summary to understand the particularities of each host and their specific needs as in the use of nutraceuticals.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

Considering the whole information obtained through the different experimental assays included in the present PhD, we can conclude:

1. The SEM observations revealed structural alterations in the worms after *in vitro* and *in vivo* contact with TR plants *O. viciifolia* and *L. latifolium*, when compared to the control worms. The main changes concerned the cuticle and the buccal area. The structural modifications of the external parts of the female reproductive systems were found under *in vitro* conditions. The structural changes found in *H. contortus* and *T. colubriformis* worms exposed to TR plants might affect their motility and nutrition with possible consequences on their reproduction.
2. The solid Nematode Growth Medium offers a good and feasible lab *in vitro* experience to analyses the effect of secondary metabolites against *C. elegans* fertility, in egg-lying and egg-hatching behavior. It also seems to be a good resource that might help us to better understand the way of actions of anthelmintic drugs against GINs. The use of methanol as solvent for some of the monomers was considerate to have a low toxicity against *C. elegans*. Any antibacterial activity against *E. coli* OP50 was detected. Difficulties on data analysis, were associated to the low number of replications, so more replications are needed to obtain a wide results data file in order to obtain stronger statistical results.
3. The importance of the use of local forages, plant parts or plant extracts in helminth control relies on their sustainable and environmental qualities. Experiences about the antiparasitic effect of *Ceratonia siliqua* remain rare. Due to the difficulties and the amount of variables that could interfere in pathophysiological, parasitological and body performances results, further investigation are needed to confirm the AH effects hypothesis and the type of secondary metabolites involved in the use of carob as a nutraceutical.
4. Sainfoin hay (*Onobrychis viciifolia*), contributes to the modulation of Trichostrongylos. No effects of Sainfoin on adult worm burden decrease, but there are evidences of effects on fertility for both species *T. colubriformis* and *H. contortus*. The cellular response of the hosts changed when supplemented with tannin rich materials, globule leucocytes increased was more evident in those animals exposed to worms for longer time, including the control animals. Eosinophils were higher in pylorus of Sainfoin treated animals. Thus, the present experimental design failed to prove any long term it could be necessary to test longer periods of tannin supplementation compared to controls to accept or discard any possible effect.
5. The interactions established between nutrition and parasitism, are multiple. The studies focused in the analysis of the numerous components involved and their interactions have not yet arisen successful recommendations to be applied in the field. Depending on a better knowledge of these interactions, the incoming of a complementary mid-term solutions would contribute to replace the reliance on synthetic molecules, to decrease the frequency of their use and at the same time, the developments of resistances among the population of worms.
6. A high number of restrictions have been found in the management of digestive strongyles in goats (a high sensibility to infestation independently to their age, restrictions in the treatments associated to the milk production and to the widespread of resistance of worms to AHs). This situation has

contributed to the emergence of a complex situation within the exclusive reliance on therapeutic drugs. Straightforward solutions are then complicated to be applied in a context of a multiple interactions complex. The goat husbandry in pastures would be the first to require the application of all the findings for an integral management, based in the combination of several methods upon the already mentioned principles and, considering the particularities of the hosts, in order to decrease the economical impacts in goats' husbandry, associated to the Strongyles of the intestinal tract. Somehow, the goat husbandry might be considered as a model to understand the way of handle the strongyles GIs to be applied afterwards, in cattle and lamb farming, where the risks, also have started increasing.

REFERENCIAS

BIBLIOGRAPHY

- Ademola, I.O., Idowu, S.O., 2006, Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* seed extract on *Haemonchus contortus* infective larvae. *Veterinary Record* 158, 485-486.
- Aerts, R.J., Barry, T.N., McNabb, W.C., 1999, Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 75, 1-12.
- Akkari, H., Ben Salem, H., Gharbi, M., Abidi, S., Darghouth, M.A., 2008, Feeding *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage to Barbarine lambs with or without PEG: Effect on the excretion of gastro-intestinal nematode eggs. *Animal Feed Science and Technology* 147, 182-192.
- Albers, G.A.A., Gray, G.D., 1987, Breeding for worm resistance: A perspective. *International Journal for Parasitology* 17, 559-566.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Hoste, H., 2008a, *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology* 153, 313-319.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Capetillo-Leal, C., Brunet, S., Hoste, H., 2008b, Short communication: Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Veterinary Parasitology* 153, 187-192.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Capetillo-Leal, C.M., 2012, Amino acid profile of the protein from whole saliva of goats and sheep and its interaction with tannic acid and tannins extracted from the fodder of tropical plants. *Small Ruminant Research* 103, 69-74.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Aguilar-Caballero, A.J., Capetillo-Leal, C.M., 2008c, Is goats' preference of forage trees affected by their tannin or fiber content when offered in cafeteria experiments? *Animal Feed Science and Technology* 141, 36-48.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Aguilar-Caballero, A.J., Capetillo-Leal, C.M., 2009, Sheep preference for different tanniniferous tree fodders and its relationship with *in vitro* gas production and digestibility. *Animal Feed Science and Technology* 151, 75-85.
- Altun, Z.F., Hall, D.H., 2009, Introduction, In: *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.1.
- Altun, Z.F., Herndon, L.A., Crocker, C., Lints, R., Hall, D.H. 2012. *WormAtlas*, (Ed.s) 2002-2010. <http://www.wormatlas.org>
- Allen, O.N., Allen, E.K., 1981, *The Leguminosae. A source book of characteristics, uses and nodulation*. The University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, 812 p.
- Anderson, R.C., 2000, *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission*, 2 Edition. CABI Publishing, New York, 650 p.
- Andlauer, W., Fürst, P., 2002, Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International* 35, 171-176.
- Andrews, S., Rolph, T., Munn, E., Taylort, M., 1997, Duration of protective immunity against ovine haemonchosis following vaccination with the nematode gut membrane antigen H11. *Research in Veterinary Science* 62 223-227.

- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A.L., Patra, A.K., Sahlu, T., Varel, V.H., Wells, J., 2008, Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Animal Feed Science and Technology* 144, 212-227.
- Anonymous, 2000, Cahier des charges concernant le mode de production et de préparation biologique des animaux et des produits animaux définissant les modalités d'application du règlement CEE No. 2092/91 modifié du Conseil et/ou complétant les dispositions du règlement CEE No. 2092/91 modifié du Conseil. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, France. 30, 88.
- Araiz, C., Château, M.T., Descamps, S., Galas, S., 2008, Génomique quantitative chez *Caenorhabditis elegans* : stratégies pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux mécanismes moléculaires chez l'homme. *Quantitative genomics in Caenorhabditis elegans: Identification strategies for new human therapeutic targets and molecular mechanisms*. IRBM 29, 289-296.
- Arena, J.P., Liu, K.K., Paress, P.S., Frazier, E.G., Cully, D.F., Mrozik, H., Schaeffer, J.M., 1995, The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. *The Journal of Parasitology* 81, 286-294.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Giannenas, I., Papachristou, T.G., 2009, Nutritional consequences on the outcome of parasitic challenges on small ruminants, Vol 85, 29-40 pp.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2000a, Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasitised with *Trichostrongylus colubriformis* *International Journal for Parasitology* 30, 1025-1033.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2000b, Effects of short-term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Record* 146, 728-732.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2001, Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Veterinary Parasitology* 99, 205-219.
- Ávalos García, A., Pérez-Urria Carril, E., 2009, Metabolismo secundario de plantas Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal* 2, 119-145.
- Baba-Moussa, F., Akpagana, K., Bouchet, P., 1999, Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 66, 335-338.
- Bahuaud, D., Martinez-Ortiz De Montellano, C., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2006, Effects of four tanniferous plant extracts on the in vitro exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 132, 545-554.
- Bailey, J.N., Kahn, L.P., Walkden-Brown, S.W., 2009, The relative contributions of *T. colubriformis*, *T. vitrinus*, *T. axei* and *T. rugatus* to sheep infected with *Trichostrongylus* spp. on the northern tablelands of New South Wales. *Veterinary Parasitology* 165 88-95.
- Baker, R.L., 1998, A review of genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in sheep and goats in the tropics and evidence for resistance in some sheep and goat breeds in sub-humid coastal Kenya. *Animal Genetic Resources Information* 24, 13-30.

- Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N., 2000a, The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Advances in Parasitology* 45, 181-241.
- Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N.T., 2000b, Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 75, 109-120.
- Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N.T., 2000c, The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants, In: *Advances in Parasitology*. pp. 181-241.
- Barger, I.A., 1993, Influence of sex and reproductive status on susceptibility of ruminants to nematode parasitism. *International Journal for Parasitology* 23, 463-469.
- Barger, I.A., 1999, The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. *International Journal for Parasitology* 29, 41-47.
- Barnes, E.H., Dobson, R.J., Barger, I.A., 1995, Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *Parasitology Today* 11, 56-63.
- Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., Hoste, H., 2005, Effect of bioactive compounds from sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology* 131, 531-538.
- Barry, T.N., 1981, Protein metabolism in growing lambs fed fresh ryegrass/white clover pasture ad libitum. Protein and energy deposition in response to abomasal infusion of casein and methionine. *British Journal of Nutrition* 26, 521-532.
- Barry, T.N., Allsop, T.F., Redekopp, C., 1986, The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. Effects on the endocrine system and on adipose tissue metabolism. *British Journal of Nutrition* 56, 607-614.
- Barry, T.N., Mc Nabb, W.C., 1999a. The effect of condensed tannins in temperate forages on animal nutrition and productivity. In: *Tannins in livestock and human nutrition: ACIAR Proceedings* (BROOKER, ed.), Canberra, Australia, pp. 30-35.
- Barry, T.N., Mc Nabb, W.C., 1999b, The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition* 81, 263-272.
- Barth, D., 1991, Magen- Darm-nematoden des dindes. Unter Mitarbeit Von Martin Visser, 284 Eizelabbildungen, ENKE, Stuttgart
- Bate-Smith, E., 1973, Tannins of herbaceous leguminosae. *Phytochemistry* 12, 1809 -1812.
- Bate-Smith, E., 1975, Phytochemistry of proanthocyanidins. *Phytochemistry* 14, 1107-1113.
- Begovic, S., Dusic, E., Sacirbegovic, A., Tafro, A., 1978, Examination of tannase activity of ruminal content and mucosa of goats on oak leaf diet and during intrn ruminal administration of 3- 10% tannic acid). *Veterinaria (Sarajevo)*. 27, 459-485.
- Beh, K.J., Maddox, J.F., 1996, Prospects for development of genetic markers for resistance to gastrointestinal parasite infection in sheep. *International Journal for Parasitology* 26, 879-897.
- Bengone-Ndong, T., Alvinerie, M., 2004, Macrolides antiparasitaires :propriétés pharmacologiques générales et recommandations d'usage dans le contexte vétérinaire africain. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 57, 49-58.

- Bennick, A., 2002, Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 13, 184-196.
- Bentounsi, B., Meradi, S., Cabaret, J., 2012, Towards finding effective indicators (diarrhoea and anaemia scores and weight gains) for the implementation of targeted selective treatment against the gastro-intestinal nematodes in lambs in a steppic environment. *Veterinary Parasitology* xxx, xxx-xxx.
- Besier, B., 2007, New anthelmintics for livestock: the time is right. *Trends in Parasitology* 23, 21-24.
- Beugnet, F., Gevrey, J., Kerboeuf, D., 1997, Les endectocides: mode d'action et utilisation. *Le Point Vétérinaire* 28.
- Bishop, S.C., Stear, M.J., 2003, Modeling of host genetics and resistance to infectious diseases: understanding and controlling nematode infections. *Veterinary Parasitology* 115, 147-166.
- Bravo, L., 1998, Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56, 317-333.
- Brugère-Picoux, J., 2004, *Maladies des moutons*. France Agricole.
- Brunet, S., Aufrère, J., El Babili, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2007, The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in presence of tannin-rich plant (sainfoin) both in vitro and in vivo. *Parasitology* 134, 1253-1262.
- Brunet, S., Fourquaux, I., Hoste, H., 2011, Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitology International* 60, 419-424.
- Brunet, S., Hoste, H., 2006, Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7481-7487.
- Brunet, S., Jackson, F., Hoste, H., 2008a, Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *International Journal for Parasitology* 38, 783-790.
- Brunet, S., Martínez-Ortiz de Montellano, C., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Capetillo-Leal, C., Hoste, H., 2008b, Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology* 157, 81-88.
- Bruneton, J., 1999, Tannins. In: *Pharmacognosie: Phytochimie Plantes Médicinales*, 3rd Edition Paris 794-796, 369-404 pp.
- Bürglin, T.R., Lobos, E., Blaxter, M.L., 1998, *Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes. *International Journal for Parasitology* 28, 395-411.
- Burnell, A.M., Houthoofd, K., O'Hanlon, K., Vanfleteren, J.R., 2005, Alternate metabolism during the dauer stage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* 40, 850-856.
- Butter, N.L., Dawson, J.M., Buttery, P.J., 1999, Effects of dietary tannins on ruminants. In: *Secondary Plant Products*. Nottingham-University-Press, Nottingham, 51-70 pp.
- Byerly, L., Cassada, R.C., Russell, R.L., 1976, The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental Biology* 51, 23-33.

- Cabaret, J., Gonnord, V., Cortet, J., Sauvé, C., Ballet, J., Tournadre, H., Benoit, M., 2006. Indicators for internal parasitic infections in organic flocks: the diarrhoea score (Disco) proposal for lambs. In: Organic Congress 2006: Organic Farming and European Rural Development., Odense (DNK), 30-31 May, pp. 552-553.
- Cabaret, J., Mage, C., Bouilhol, M., 2002, Helminth intensity and diversity in organic meat sheep farms in centre of France. *Veterinary Parasitology* 105, 33-47.
- Calderón-Quintal, J.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Alonso-Díaz, M.A., Hoste, H., 2010, Adaptation of *Haemonchus contortus* to condensed tannins: can it be posible? . *Archivos de Medicina Veterinaria* 42, 165-171.
- Callinan, A.P.L., 1978, The ecology of the free-living stages of *Trichostrongylus axei*. *International Journal for Parasitology* 8, 453-456.
- Campbell, W.C., Benz, G.W., 1984, Ivermectin: A review of efficacy and safety *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 7, 1-16
- Cenci, F.B., Louvandini, H., McManus, C.M., Dell'Porto, A., Costa, D.M., Araújo, S.C., Minho, A.P., Abdalla, A.L., 2007, Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminthes. *Veterinary Parasitology* 144, 132-137.
- Collingborn, F.M.B., Gowen, S.R., Mueller-Harvey, I., 2000, Investigations into the biochemical basis for nematode resistance in roots of three *Musa* cultivars in response to *Radopholus similis* infection. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5297-5301.
- Commission Regulation (EU) 22 December 2009. Commission Regulation (EU) N° 37/2010 of on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin (Official Journal of the European Union), pp. L 15/11-L15/72.
- Consejo Unión Europea 20 Julio 2007. REGLAMENTO (CE) n° 834/2007 DEL CONSEJO de 28 de junio de 2007 sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CEE) n° 2092/91 (Diario Oficial de la Unión Europea), pp. L 189/181 - L 189/123.
- Coop, R.L., Kyriazakis, I., 1999, Nutrition-parasite interaction. *Veterinary Parasitology* 84, 187-204.
- Coop, R.L., Kyriazakis, I., 2001, Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends in Parasitology* 17, 325-330.
- Cully, D.F., Vassilatis, D.K., Liu, K.K., Paress, P.S., Van der Ploeg, L.H., Schaeffer, J.M., Arena, J.P., 1994, Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 371, 707-711.
- Chandrawathani, P., Jamnah, O., Adnan, M., Waller, P.J., Larsen, M., Gillespie, A.T., 2004, Field studies on the biological control of nematode parasites of sheep in the tropics, using the microfungus *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology* 120, 177-187.
- Chartier, C., Hoste, H., 1994, Anthelmintic treatments against digestive-tract nematodes in grazing dairy goats with high or low levels of milk production. *Veterinary Research* 25, 450-457.
- Chartier, C., Hoste, H., 1997, Response to challenge infection with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in dairy goats differences between high and low-producers. *Veterinary Parasitology* 73, 267-276.

- Chartier, C., Hoste, H., 2004, L'utilisations des anthelminthiques chez la chèvre: efficacité et durabilité. Bulletin des GTV- Hors série parasitologie des ruminants laitiers, 337-342.
- Chartier, C., Itard, J., Morel, P., Troncy, P., 2000, Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Collection Universités Francophones. Lavoisier Tech & Toc, Paris, 796 p.
- Chen, J., Lewis, E.E., Carey, J.R., Caswell, H., Caswell-Chen, E.P., 2006, The ecology and biodemography of *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* 41, 1059-1065.
- Chung, K.T., Wei, C.I., Johnson, M.G., 1998, Are tannins a double-edged sword in biology and health? . *Trends in Food Science and Technology* 9, 168-175.
- Dakkak, A., Dorchies, P., 1984, Kinetics of the population of worms in various developmental stages, *Haemonchus contortus* in sheep after a single experimental infection. *Annales de recherches vétérinaires. Annals of veterinary research.* 15, 475-482.
- Diez-Baños, N., Cabaret, J., Diez-Baños, P., 1992, Interspecific interactions in naturally acquired nematode communities from sheep abomasum in relation to age of host and season in four areas of Leon (Spain). *International Journal for Parasitology* 22, 327-334.
- Díez, M.T., García del Moral, P., Resines, J.A., Arín, M.J., 2008, Determination of phenolic compounds derived from hydrolysable tannins in biological matrices by RPHPLC. *J. Sep. Sci.* 31, 2797-2803.
- Dimander, S.O., Höglund, J., Uggla, A., Spörndly, E., Waller, P.J., 2003, Evaluation of gastrointestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden. *Veterinary Parasitology* 111, 193-209.
- Doner, L.W., Becard, G., Irwin, P.L., 1993, Binding of flavonoids by polyvinylpolypyrrolidone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 753-757.
- Dougherty, R.W. 2010. Bloat in Ruminants.
- Durette-Desset, M.C., 1985, Trichostrongyloid nematodes and their vertebrate hosts: reconstruction of the phylogeny of a parasite group. *Advances in Parasitology* 24.
- Emery, D.L., McClure, S.J., Davey, R.J., Bendixsen, T., 1999, Induction of protective immunity to *Trichostrongylus colubriformis* in neonatal Merino lambs. *International Journal for Parasitology* 29, 1037-1046.
- Erzen, N.K., Kolar, N.K., Flajs, V.C., Kuzner, J., Irena, M., Pogacnik, M., 2005, Degradation of Abamectin and Doramectin on sheep grazed pasture. *Ecotoxicology* 14, 627-635.
- Euzéby, J., 1963, Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine, In: Freres, V. (Eds.). *Maladies dues aux Nematelminthes*. Paris, p. 843.
- Feucht, W., Treutter, D., 1999a, The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defense. In: *Principles and practices in chemical ecology*. Press and Boca Ratón (Eds.), 307-338 pp.
- Feucht, W., Treutter, D., 1999b, The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defense. In: *Principles and practices in chemical ecology*. Press and Boca Ratón (Eds.), 307-338 pp.
- Fontenot, M.E., Miller, J.E., Peña, M.T., Larsen, M., Gillespie, A., 2003, Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. *Veterinary Parasitology* 118, 203-213.

- Foo, L.Y., Jones, W.T., Porter, L.J., Williams, V.M., 1982, Proanthocyanidin polymers of fodder legumes. *Phytochemistry* 21 933-935.
- Foreyt, W.J., 2001, *Veterinary parasitology reference manual*. Iowa State University Press, Edition: 5th Revised edition, 235 p.
- Fox, M.T., 1997, Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Veterinary Parasitology* 72, 285-308.
- Fox, M.T., Uche, U.E., Vaillant, C., Ganabadi, S., Calam, J., 2002, Effects of *Ostertagia ostertagi* and omeprazole treatment on feed intake and gastrin-related responses in the calf. *Veterinary Parasitology* 105, 285-301.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., 2004, Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2, 191-202.
- Frutos, P., Hervas, G., Ramos, G., Giraldez, F.J., Mantecon, A.R., 2002, Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Animal Feed Science and Technology* 95, 215-226.
- Garretson, D.P., 2007. Role of p-glycoproteins in *Haemonchus contortus* anthelmintic resistance. Texas A&M University,
- Geary, T.G., Sims, S.M., Thomas, E.M., Vanover, L., Davis, J.P., Winterrowd, C.A., Klein, R.D., Ho, N.F.H., Thompson, D.P., 1993, *Haemonchus contortus*: Ivermectin-induced paralysis of the pharynx. *Experimental Parasitology* 77, 88-96.
- Geary, T.G., Thompson, D.P., 2001, *Caenorhabditis elegans*: how good a model for veterinary parasites? *Veterinary Parasitology* 101, 371-386.
- Githiori, J.B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., 2006, Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology* 139, 308-320.
- Githiori, J.B., Hoglund, J., Waller, P.J., 2005, Ethnoveterinary plant preparations as livestock dewormers: practices, popular beliefs, pitfalls and prospects for the future. *Animal Health Research* 6, 91-103.
- Gómez Rincón, C.F., 2006. Valoración del hongo nematófago *Duddingtonia flagrans* como agente de control biológico de los nemátodos gastrointestinales en pequeños rumiantes. Universidad de Zaragoza, Zaragoza.
- González-Garduño, R., Cordero Ortega, J.C., Torres-Hernández, G., Arece-García, J., Mendoza-de-Gives, P., 2010, The effect of sodium hypochlorite and a citric extract on the reduction of anthelmintic-resistant gastrointestinal nematodes in hair sheep. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 1, 179-187.
- Goplen, B., Howarth, R.E., Sarkar, S.K., Lesins, K., 1980, A Search for Condensed Tannins in Annual and Perennial Species of *Medicago*, *Trigonella*, and *Onobrychis*. *Crop Science* 20, 801 - 804.
- Gray, G.D., 1991, Breeding for resistance to *Trichostrongylus* nematodes in sheeps. In: Owen, J. B. Y Axford R.F.E. (Eds.), *Breeding for disease resistance in farms animals*. CAB International. Wallingfor, 139-161 pp.

- Gray, G.D., Barger, I.A., Le Jambre, L.F., Douch, P.G., 1992, Parasitological and immunological responses of genetically resistant Merino sheep on pastures contaminated with parasitic nematodes. *International Journal for Parasitology* 22, 417-725.
- Gruner, L., Bouix, J., Brunel, J.C., 2004, High genetic correlation between resistance to *Haemonchus contortus* and to *Trichostrongylus colubriformis* in INRA 401 sheep. *Veterinary Parasitology* 119, 51-58.
- Hagerman, A.E. 2002a. *Tannin Handbook* (Miami University, Oxford OH 45056).
- Hagerman, A.E., 2002b, *The Tannin Handbook Condensed tannin structural chemistry*. Copyright 1998, 2002, 2011
- Hagerman, A.E., 2002c, *The Tannin Handbook: Biological activities of tannins*. Copyright 1998, 2002, 2011
- Harbone, J.B., 1993, *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press, London, 318 p.
- Haslam, E., 1989, *Plant Polyphenols-Vegetable Tannins Revisited* Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Haslam, E., 1996, Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products* 59, 205-215.
- Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T.-O., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T., 2005, Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 66 2047-2055.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Senn, M., Hertzberg, H., 2007, Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Veterinary Parasitology* 146, 123-134.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W., Hertzberg, H., 2006, Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Veterinary Parasitology* 142 293-300.
- Hedqvist, H., Mueller-Harvey, I., Reed, J.D., Krueger, C.G., Murphy, M., 2000, Characterisation of tannins and in vitro protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. *Animal Feed Science and Technology* 87, 41-56.
- Henry, B.A., Goding, J.W., Alexander, W.S., Tilbrook, A.J., Canny, B.J., Dunshea, F., Rao, A., Mansell, A., Clarke, I.J., 1999, Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion of hormones from the pituitary gland: evidence for a dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. *Endocrinology* 140, 1175-1182.
- Hermansen, J.E., 2003, Organic livestock production systems and appropriate development in relation to public expectations. *Livestock Production Science* 80, 3-15.
- Hertzberg, H., Huwyler, U., Kohler, L., Rehbein, S., Wanner, M., 2002, Kinetics of exsheathment of infective ovine and bovine strongylid larvae in vivo and in vitro. *Parasitology* 125, 65-70.
- Hervás, G., Pérez, V., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., Almar, M.M., Frutos, P., 2003, Intoxication of Sheep with Quebracho Tannin Extract. *Journal of Comparative Pathology* 129, 44-54.

- Hess, H.D., Tiemann, T.T., Noto, F., Carulla, J.E., Kreuzer, M., 2006a, Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. *Int. Congress Series* 1293, 164-167.
- Hess, H.D., Tiemann, T.T., Stürm, C.D., Carulla, J.E., Lascano, C.E., Kreuzer, M., 2006b, Effects of tannins on ruminal degradation and excretory pattern of N and implications for the potential N emission from the manure. *Int. Congress Series* 1293, 339-342.
- Hiepe, T., Lucius, R., Gottstein, B., 2006, *Parasitología general. Con principios de inmunología, diagnóstico y lucha antiparasitaria*, Editorial ACRIBIA, S.A. Edition Zaragoza (España), 600 p.
- Hoberg, E., P., Zimmerman, G., L., Lichtenfels, J.R., 1986, First Report of *Nematodirus battus* (Nematoda: Trichostrongyloidea) in North America: Redescription and Comparison to Other Species. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 53, 80-88.
- Hofmann, R.R., 1989, Evolutionary Steps of Ecophysiological Adaptation and Diversification of Ruminants: A Comparative View of Their Digestive System. *Oecologia* 78, 443-457.
- Holden-Dye, L., Walker, R.J., 2007, Anthelmintic drugs. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community.
- Holmes, P.H., 1993, Interactions between parasites and animal productions: the veterinary consequences. *Proceedings of the Nutrition Society* 52, 113-120.
- Hördegen, P., Cabaret, J., Hertzberg, H., Langhans, W., Maurer, V., 2006, In vitro screening of six anthelmintic plant products against larval *Haemonchus contortus* with a modified methylthiazolyl-tetrazolium reduction assay. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 85-89.
- Hosking, B.C., Kaminsky, R., Sager, H., Rolfe, P.F., Seewald, W., 2010, A pooled analysis of the efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative against gastrointestinal nematodes of sheep *Parasitology Research* 106, 529-532.
- Hoste, H., 1989, *Trichostrongylus colubriformis*: epithelial cell kinetics in the small intestine of rabbits. *Experimental Parasitology* 68, 99-104.
- Hoste, H., Chartier, C., 1993, Comparison of the effects on milk production of concurrent infection with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in high- and low-producing dairy goats *American Journal of Veterinary Research* 54, 1886-1893.
- Hoste, H., Chartier, C., Lefrileux, Y., Goudeau, C., Broqua, C., Pors, I., Bergeaud, J.P., Dorchies, P., 2002a, Targeted application of anthelmintics to control trichostrongylosis in dairy goats: result from a 2-year survey in farms. *Veterinary Parasitology* 110, 101-108.
- Hoste, H., Huby, F., Mallet, S., 1997, Strongyloses gastro-intestinales des ruminants: Conséquences physiopathologiques et mécanismes pathogéniques. *Le Point Vétérinaire* 28, 53-59.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006, The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology* 22, 253-261.
- Hoste, H., Kerboeuf, D., Parodi, A.L., 1988, *Trichostrongylus colubriformis*: effects on villi and crypts along the whole small intestine in infected rabbits. *Experimental Parasitology* 67, 39-46.
- Hoste, H., Le Frileux, Y., Pommet, A., 2002b, Comparison of selective and systematic treatments to control nematode infection of the digestive tract in dairy goats. *Veterinary Parasitology* 106, 345-355.

- Hoste, H., Manolaraki, F., Brunet, S., Arroyo López, C., Martinez-Ortiz De Montellano, C., Sotiraki, S., Torres-Acosta, F., 2011. The anthelmintic properties of tannin-rich legume forages: from knowledge to exploitation in farm conditions. In: Challenging strategies to promote the sheep and goat sector in the current global context, pp. 295-304.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2011, Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary Parasitology* 180, 144-154.
- Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., 2012, Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology* 186, 18-27.
- Hoste, H., Nano, J.L., Mallet, S., Huby, F., Fournel, S., Rampal, P., 1995, Stimulation of HT29-D4 cell growth by excretory/secretory products of the parasite nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Epithelial Cell Biology* 4, 87-92.
- Hoste, H., Paolini, V., Paraud, C., Chartier, C., 2004, Gestion non-chimique du parasitisme par les nématodes chez les petits ruminants. *Bulletin G.T.V.*, 131-135.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F., Paolini, V., Aguilar-Caballero, A., Etter, E., Lefrileux, Y., Chartier, C., Broqua, C., 2005, Interactions between nutrition and gastrointestinal infections with parasitic nematodes in goats. *Small Ruminant Research* 60, 141-151.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2011, Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary Parasitology* 180, 144-154.
- Hotez, P., Hawdon, J., Schad, G.A., 1993, Hookworm larval infectivity, arrest and amphiparatenesis: The *Caenorhabditis elegans* Daf-c paradigm. *Trends in Parasitology* 9, 23-26.
- Hounzangbe-Adote, S., 2004. Propriétés anthelminthiques de 4 plantes tropicales testées in vitro et in vivo sur les nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants Djallonké. Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin.
- Huby, F., Nano, J.-L., Mallet, S., Hoste, H., 1999, Effects of the excretory/secretory products of *Trichostrongylus colubriformis* on the growth of different cell lines. *International Journal for Parasitology* 29, 697-702.
- Humphries, J.M., Hughes, S.J., (Australia), C.f.P.B.M.o.D.S., 2006, Pharmaceutical, nutraceutical and industrial potential of temperate legumes. [Crawley, W.A.]: CRC for Plant-Based Management of Dryland Salinity 174 p.
- Huntley, J.F., Gibson, S., Brown, D., Smith, W.D., Jackson, F., Miller, H.R., 1987, Systemic release of a mast cell proteinase following nematode infections in sheep. *Parasite Immunology* 9, 603-614.
- Jackson, F., Coop, R.L., 2000, The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120, 95-107.
- Jackson, F., Hoste, H., 2010, In vitro methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. Vercoe, P.E., Makkar, H.P.S., Schlink, A.C. (Eds.), *In Vitro Screening of Plant Resources for Extra Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies*, FAO/IAEA Springer Edition, 24-45 pp.

- Jackson, F., Miller, J., 2006, Alternative approaches to control: Quo vadit? . *Veterinary Parasitology* 139, 371-384.
- Jackson, F., Varady, M., Bartley, D.J., 2012, Managing anthelmintic resistance in goats_Can we learn lessons from sheep? *Small Ruminant Research* 103, 3-9.
- Jacquiet, P., 1997, Les strongles digestives des ruminants. *Le point vétérinaire*. N° Especial. *Parasitologie des ruminants* 28, 20-22.
- Jacquiet, P., Colas, F., Cabaret, J., Dia, M.L., Cheikh, D., Thiam, A., 1995, Dry areas: an example of seasonal evolution of helminth infection of sheep and goats in southern Mauritania *Veterinary Parasitology* 56, 137-148
- Jasmer, D.P., McGuire, T.C., 1991, Protective immunity to a blood-feeding nematode (*Haemonchus contortus*) induced by parasite gut antigens. *Infect Immun* 59, 4412-4417.
- Jean-Blain, C., 1998, Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Revue de Médecine Vétérinaire* 149, 911-920.
- Jensen, J., Henning Krogh, P., Sverdrup, L.E., 2003, Effects of the antibacterial agents tiamulin, olanquinox and metronidazole and the anthelmintic ivermectin on the soil invertebrate species *Folsomia fimetaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae). *Chemosphere* 50, 437-443.
- Johnstone, C., Guerrero, J.C., Howe-Smith, R.C., Eisenberg, A.C., Hobday, M.C., Fariás-Llovet, O.C., Chou, S.C., Varela, R.C. 1998. *Parásitos y enfermedades parasíticas de los animales domésticos*, La Fundación Merck en nombre de Merial Inc. Universidad de Pennsylvania, E.d.M.V., ed.
- Jones, D.E., 1965, Banana tannin and its reaction with polyethilen glycol. *Nature* 206, 299-300.
- Jones, W.T., Mangan, J.L., 1977, Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* scop.) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28, 126-136.
- Jung, Y.D., Ellis, L.M., 2001, Inhibition of tumour evasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. *Int. J. Exp. Path.* 82, 309-316.
- Kahiya, C., Mukaratirwa, S., Thamsborg, S.M., 2003, Effects of *Acacia nilotica* and *Acacia karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. *Veterinary Parasitology* 115, 265-274.
- Kahn, L.P., Díaz-Hernández, A., 2000. Tannins with anthelmintic properties. In: *Tannins in livestock and human nutrition: ACIAR Proceedings N° 92*. International workshop, Adelaide, Australia, pp. 140-149.
- Kahn, L.P., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2000, Temporal effects of protein nutrition on the growth and immunity of lambs infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology* 30, 193-205.
- Kaminsky, R., Bapst, B., Stein, P.A., Strehlau, G.A., Allan, B.A., Hosking, B.C., Rolfe, P.F., Sager, H., 2011, Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multi-resistant nematodes of sheep. *Parasitology Research* 109, 19-23.

- Kaminsky, R., Gauvry, N., Schorderet Weber, S., Skripsky, T., Bouvier, J., Wenger, A., Schroeder, F., Desaulles, Y., Hotz, R., Goebel, T., Hosking, B.C., Pautrat, F., Wieland-Berghausen, S., Ducray, P., 2008, Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitology Research* 103, 931-939.
- Kaplan, R.M., 2004, Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology* 20, 477-481.
- Karanu, F.N., McGuire, T.C., Davis, W.C., Besser, T.E., Jasmer, D.P., 1997, CD4+ T lymphocytes contribute to protective immunity induced in sheep and goats by *Haemonchus contortus* gut antigens. *Parasite Immunology* 19, 435-445.
- Keisler, D.H., Daniel, J.A., Morrison, C.D., 1999, The role of leptin in nutritional status and reproductive function. *Journal of reproduction and fertility* 54, 425-435.
- Kenyon, F., Greer, A.W., Coles, G.C., Cringoli, G., Papadopoulos, E., Cabaret, J., Berrag, B., Varady, M., Van Wyk, J.A., Thomas, E., Vercruysse, J., Jackson, F., 2009, The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Veterinary Parasitology* 164, 3-11.
- Ketzis, J.K., Vercruysse, J., Stromberg, B.E., Larsen, M., Athanasiadou, S., Houdijk, J.G.M., 2006, Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. *Veterinary Parasitology* 139, 321-335.
- Khan, W.I., Blennerhasset, P., Ma, C., Matthaei, K.I., Collins, S.M., 2001, Stat6 dependent goblet cell hyperplasia during intestinal nematode infection. *Parasite Immunology* 23, 39-42.
- Knox, D.P., Redmond, D.L., Skuce, P.J., Newlands, G.F.J., 2001, The contribution of molecular biology to the development of vaccines against nematode and trematode parasites of domestic ruminants *Veterinary Parasitology* 101, 311-335.
- Knox, D.P., Smith, W.D., 2001, Vaccination against gastrointestinal nematode parasites of ruminants using gut-expressed antigens. *Veterinary Parasitology* 100, 21-32.
- Knox, M.R., Torres-Acosta, J.F., Aguilar-Caballero, A.J., 2006, Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 139 385-393.
- Koupai-Abyazani, M.R., McCallum, J., Bohm, B.A., 1992, Identification of the constituent flavanoid units in sainfoin proanthocyanidins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 594, 117-123.
- Koupai-Abyazani, M.R., Muir, A.D., Bohm, B.A., Towers, G.H.N., Grubert, M.Y., 1993, The proanthocyanidin polymers in some species of *Onobrychis*. *Phytochemistry* 34, 113-117.
- Kumar, R., Singh, M., 1984, Tannins: their adverse role in ruminant nutrition *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32, 447-453.
- Kyriazakis, I., Anderson, D.H., Oldham, J.D., Coop, R.L., Jackson, F., 1996, Long-term subclinical infection with *Trichostrongylus colubriformis*: effects on food intake, diet selection and performance of growing lambs. *Veterinary Parasitology* 61, 297-313.

- Kyriazakis, I., Houdijk, J., 2006, Immunonutrition: Nutritional control of parasites. *Small Ruminant Research* 62, 79-82.
- Lacey, E., 1988, The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology* 18, 885-936.
- Lacey, E., Prichard, R.K., 1986, Interactions of benzimidazoles (BZ) with tubulin from BZ-sensitive and BZ-resistant isolates of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 19, 171-181.
- Lacroux, C. 2006. Régulation des populations de Nématodes gastro-intestinaux (*Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis*) dans deux races ovines (Toulouse, INRA 401 et Barbados Black Belly. INP Toulouse).
- Lacroux, C., Nguyen, T.H.C., Andreoletti, O., Prevot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.-P., Gruner, L., Brunel, J.-C., François, D., Dorchie, P., Jacquet, P., 2006, *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Veterinary Research* 37, 607-622
- Laguna Lumbreras, E., 1997, Sobre el origen de algunas especies vegetales cultivadas del sistema ibérico. *Flora Monteibérica* 7, 32-43.
- Landau, S., Silanikove, N., Nitsan, Z., Barkai, D., Baram, H., Provenza, F.D., Perevolotsky, A., 2000, Short-term changes in eating patterns explain the effects of condensed tannins on feed intake in heifers. *Applied Animal Behaviour Science* 69, 199-213.
- Lange, K.C., Olcott, D.D., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Terrill, T.H., Burke, J.M., Kearney, M.T., 2006, Effect of sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lambs. *Veterinary Parasitology* 141, 273-278.
- Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993, Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. *Drug Metabolism Review* 25, 235-279.
- Larrauri, J.A., Rupérez, P., Saura-Calixto, F., 1997, Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1390-1393.
- Larsen, M., Nansen, P., Gronvold, J., Wolstrup, J., Henriksen, S.A., 1997, Biological control of gastrointestinal nematodes- facts, future, or fiction? *Veterinary Parasitology* 72, 479-492.
- Lees, G.L., Gruber, M.Y., Suttill, N.H., 1995, Condensed tannins in sainfoin II. Occurrence and changes during leaf development. *Canadian Journal of Botany* 73, 1540-1547.
- Legarto, J., Leclerc, M.C., 2007, Guide pour la conduite du pâturage caprin. *Institute d'Elevage*, 212 p.
- Li, Y.-G., Tanner, G., Larkin, P., 1996, The DMACA-HCl Protocol and the Threshold Proanthocyanidin Content for Bloat Safety in Forage Legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70, 89-101.
- Lord, G., 2002, Role of leptin in immunology. *Nutrition Reviews* 60, 35-38, 68-84.
- Lubega, G.W., Prichard, R.K., 1991, Interaction of benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin: Binding affinity and anthelmintic efficacy. *Experimental Parasitology* 73, 203-213.

- Lukovich, R. 1981. Identificación de las formas adultas de los nematodos gastrointestinales y pulmonares de los rumiantes en la República Argentina (Buenos Aires, Publicación miscelánea de INTA), pp. 1-33.
- Lumaret, J.P., Erroussi, F., 2002, Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non target fauna of pastures. *Veterinary Research* 33, 547-562.
- Lumaret, J.P., Martínez, I., 2005, El impacto de productos veterinarios sobre insectos coprófagos: consecuencias sobre la degradación del estiércol en pastizales. *Acta Zoológica Mexicana* 21, 137-148.
- MAFF, 1986, Manual of veterinary parasitology laboratory techniques. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- Makkar, H.P., Blummel, M., Becker, K., 1995, Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques. *British Journal of Nutrition* 73 897-913.
- Makkar, H.P.S., 2003, Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research* 49, 241-256.
- Mallet, S., Lesage, M.C., 1987, Relationship between exsheathment and enzyme activity (alkaline phosphatase and leucine amino peptidase) during ageing of *Trichostrongylus colubriformis* infective larvae. *Annales de recherches vétérinaires* 18, 275-278.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982, Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 68 p.
- Manolaraki, F., 2011. Propriétés anthelminthiques du sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) : Analyse des facteurs de variations et du rôle des composés phénoliques impliqués. Toulouse.
- Manolaraki, F., Sotiraki S., Stefanakis A., Skampardonis V., Volanis M., Hoste H., 2010, Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology* 137, 685-696.
- Marais, J.P.J., Mueller-Harvey, I., Brandt, E.V., Ferreira, D., 2000, Polyphenols, condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3440-3447.
- Marakis, S., 1996, Carob bean in food and feed: current status and future potentials—a critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology* 33, 365-383.
- Marley, C.L., Cook, R., Keatinge, R., Barrett, J., Lampkin, N.H., 2003, The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. *Veterinary Parasitology* 112, 147-155.
- Márquez Lara, D., 2007, Resistencia a los antihelmínticos en nematodos de rumiantes y estrategias para su control. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica y Colciencias Bogotá, 168 p.
- Martin, R.J., 1997, Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal* 154, 11-34.
- Martín, R.J., 1997, Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal* 154, 11-34.

- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M., Tuñón, M.J., 2002, Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* XVII, 271-278.
- Martínez-Ortiz-De-Montellano, C., Vargas-Magaña, J.J., Canul-Ku, H.L., Miranda-Soberanis, R., Capetillo-Leal, C., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2010, Effect of a tropical tannin-rich plant, *Lysiloma latisiliquum*, on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology* 172, 283-290.
- Martínez-Ortiz de Montellano, C., Arroyo-López, C., Fourquaux, I., Brunet, S., Torres-Acosta, F., Sandoval-Castro, C., Hoste, H. 2009. Observations by scanning electron microscopy of the changes induced to *Haemonchus contortus* after contact with two tanniniferous plants in in vitro and in vivo conditions. In *Congrès de la Société Française de Parasitologie et de la Société Française de Mycologie Médicale (Poitiers)*.
- Martínez, M.A., 2005, Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín.
- Mbhata, K.R., Downs, C.T., Nsahlai, I.V., 2002, The effect of graded levels of dietary tannin on the epithelial tissue of the gastro-intestinal tract and liver and kidney masses of boer goats. *Animal science* 74, 579-586.
- Mc Nabb, W.C., Waghorn, G., Barry, T.N., Shelton, I.D., 1993, The effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on the digestion and metabolism of methionine, cystine and inorganic sulphur in sheep. *British Journal of Nutrition* 70, 647-661.
- McKellar, Q.A., 1997, Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology*. 72, 413-435.
- McLeod, M.N., 1974, Plants tannins - their role in forage quality. *Nutrition Abstracts & Reviews* 44, 803-815.
- McNabb, W.C., Waghorn, G.C., Peters, J.S., Barry, T.N., 1996, The effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on the solubilization and degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (EC 4.1.1.39; Rubisco) protein in the rumen and the sites of Rubisco digestion. *British Journal of Nutrition* 76, 535-549.
- McSweeney, C.S., Collins, E.M.C., Blackall, L.L., Seawright, A.A., 2008, A review of anti-nutritive factors limiting potential use of *Acacia angustissima* as a ruminant feed. *Animal Feed Science and Technology* 147, 158-171.
- McSweeney, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M., Krause, D.O., 2001, Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 91, 83-93.
- Merck, S., Dohme, C. 2011. *The Merck Veterinary Manual* (NJ USA, Merck & Co., Inc.Whitehouse Station).
- Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T., McNabb, W.C., 2003, The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology* 106, 3-19.
- Min, B.R., Hart, S.P., 2003, Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science* 81, 102-109.

- Min, B.R., Hart, S.P., Miller, D., Tomita, G.M., Loetz, E., Sahl, T., 2005, The effect of grazing forage containing condensed tannins on gastrointestinal parasite infection and milk composition in Angora does. *Veterinary Parasitology* 130, 105-113.
- Min, B.R., Pomroy, W.E., Hart, S.P., Sahl, T., 2004, The effect of short term consumption of forage containing condensed tannins on gastrointestinal nematode parasite infections in grazing wethers. *Small Ruminants Research* 51, 279-283.
- Molan, A.L., Alexander, R.A., Brookes, I.M., McNabb, W.C., 2000a, Effect of an extract from *Sulla* (*Hedysarum coronarium*) containing condensed tannins on the migration of three sheep gastrointestinal nematodes in vitro. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 60, 21-25.
- Molan, A.L., Duncan, A.J., Barry, T.N., McNabb, W.C., 2003a, Effects of condensed tannins and crude sesquiterpene lactones extracted from chicory on the motility of larvae of deer lungworm and gastrointestinal nematodes. *Parasitology International* 52, 209-218.
- Molan, A.L., Hoskin, S.O., Barry, T.N., McNabb, W.C., 2000b, Effect of condensed tannins extracted from four forages on the viability of the larvae of deer lungworms and gastrointestinal nematodes. *Veterinary Record* 147, 44-48.
- Molan, A.L., Meagher, L.P., Spencer, P.A., Sivakumaran, S., 2003b, Effect of flavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology* 33, 1691-1698.
- Molan, A.L., Sivakumaran, S., Spencer, P.A., Meagher, L.P., 2004, Green tea flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins inhibit the motility of infective larvae of *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in vitro. *Research in Veterinary Science* 77, 239-243.
- Molan, A.L., Waghorn, G.C., McNabb, W.C., 2002, The impact of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis* in vitro. *Veterinary Record* 150, 65-69.
- Moreno-Guzman, M.J., Coles, G.C., Jimenez-Gonzalez, A., Criado-Fornelio, A., Ros-Moreno, R.M., Rodriguez-Cabeiro, F., 1998, Levamisole binding sites in *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology* 28, 413-418.
- Mueller-Harvey, I., 2001, Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 91, 3-20.
- Mueller-Harvey, I., 2006, Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86, 2010-2037.
- Mueller-Harvey, I., Mc Allan, A.B., 1992, Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Advances in plant cell biochemistry and biotechnology* 1, 151-217.
- Muir, L.A., Wien, S., Duquette, P.F., Rickes, E.L., Cordes, E.H., 1983, Effect of exogenous growth hormone and diethylstilbestrol on growth and carcass composition of growing lambs. *Journal of Animal Science* 56, 1315-1323.
- Muleke, C.I., Yan, R., Sun, Y., Zhao, G., Xu, L., Li, X., 2007, Vaccination of goats against *Haemonchus contortus* with a recombinant cysteine protease. *Small Ruminant Research* 73, 95-102.

- Muller, S., 2002, Short communication: Appropriate agricultural management practices required to ensure conservation and biodiversity of environmentally sensitive grassland sites designated under Natura 2000. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 89, 261-266.
- Mulligan, W., Gordon, H.M.L., D.F., S., B.M., W., 1961, The use of irradiated larvae as immunizing agents in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* infections in sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 12, 1175-1187.
- Munn, E.A., Smith, T.S., Smith, H., James, F.M., Smith, F.C., Andrews, S.J., 1997, Vaccination against *Haemonchus contortus* with denatured forms of the protective antigen H11. *Parasite Immunology* 19, 243-248.
- Naczek, M., Shahidi, F., 2004, Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054, 95-111.
- Newton, S.E., 1995, Progress on vaccination against *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology* 25, 1281-1289.
- Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Hodgson, J., Mackay, A.D., Leathwick, D.M., 1996, Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics: Approaches, experiences and prospects. *International Journal for Parasitology* 26, 983-992.
- Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Robertson, H.A., Shelton, D., Waghorn, G.C., Green, R., 2002a, The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 105, 229-245.
- Niezen, J.H., Robertson, H.A., Waghorn, G.C., Charleston, W.A.G., 1998a, Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. *Veterinary Parasitology* 80, 15-27.
- Niezen, J.H., Waghorn, G.C., Charleston, W.A.G., 1998b, Establishment and fecundity of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in lambs fed lotus (*Lotus pedunculatus*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Veterinary Parasitology* 78, 13-21.
- Niezen, J.H., Waghorn, G.C., Graham, T., Carter, J.L., Leathwick, D.M., 2002b, The effect of diet fed to lambs on subsequent development of *Trichostrongylus colubriformis* larvae in vitro and on pasture. *Veterinary Parasitology* 105, 269-283.
- Niezen, J.H., Waghorn, T.S., Charleston, W.A.G., Waghorn, G.C., 1995, Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *The Journal of Agricultural Science* 125, 281-289.
- Niezen, J.H., Waghorn, T.S., Waghorn, G.C., Charleston, W.A.G., 1993, Internal parasites and lamb production - a role for plants containing condensed tannins? In: *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, pp. 235-238.
- Norton, B.W., 1999, The significance of tannins in tropical animal production. In: *Tannins in livestock and human nutrition*, ACIAR proceedings, Adelaide, Australia, pp. 14-23.

- O'Connor, L.J., Walkden-Brown, S.W., Kahn, L.P., 2006, Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology* 142, 1-15.
- Obeidat, B.S., Arababab, M.A., Abdullah, A.Y., Alhamad, M.N., Gharaibeh, M.A., Rababah, T.M., Abu Ishmais, M.A., 2011, Growth performance and carcass characteristics of Awassi lambs fed diets containing carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). *Small Ruminant Research* 96, 149-154.
- Ojeda-Robertos, N., Manolaraki, F., Theodoridou, K., Aufrère, J., Halbwirth, H., Stich, K., Regos, I., TReutter, D., Mueller-Harvey, I., Hoste, H., 2010. The anthelmintic effect of sainfoin (silage, hay, fresh) and the role of flavonoid glycosides. In: EAAP, 61st Annual Meeting, Crete Island, Heraklion, 20-24th august.
- Ojeda-Robertos, N., Torres-Acosta, J., Ayala-Burgos, A., Sandoval-Castro, C., Valero-Coss, R., Mendoza-de-Gives, P., 2009, Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in ruminants: in vitro and in vivo studies. *BMC Veterinary Research* 5, 46.
- Ortiz, P.L., 1999, *Ceratonia* L., In: Flora ibérica. Plantas vasculares de la península Ibérica e islas Baleares: (Castroviejo, S. et al.). Real Jardín Botánico. CSIC, Madrid, pp. 29-32.
- Osoro, K., Benito-Peña, A., Frutos, P., García, U., Ortega-Mora, L.M., Celaya, R., Ferre, I., 2007, The effect of heather supplementation on gastrointestinal nematode infections and performance in Cashmere and local Celtiberic goats on pasture. *Small Ruminant Research* 67, 184-191.
- Paolini, V., Bergeaud, J.P., Grisez, C., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2003a, Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 113, 253-261.
- Paolini, V., De La Farge, F., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2005a, Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 127, 277-283.
- Paolini, V., Dorchies, P., Hoste, H., 2003b, Effects of sainfoin hay on gastrointestinal nematode infections in goats. *Veterinary Record* 152, 600-601.
- Paolini, V., Fouraste, I., Hoste, H., 2004, In vitro effects of three woody plant and sainfoin extracts on third-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology* 129, 69-77.
- Paolini, V., Frayssines, A., De La Farge, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2003c, Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Veterinary Research* 34, 331- 339.
- Paolini, V., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2005b, Lack of effects of quebracho and sainfoin hay on incoming third-stage larvae of *Haemonchus contortus* in goats. *The Veterinary Journal* 170, 260-263.
- Papachristou, T.G., Dziba, L.E., Provenza, F.D., 2005, Foraging ecology of goats and sheep on wooded rangelands. *Small Ruminant Research* 59, 141-156.
- Paraud, C., Hoste, H., Lefrileux, Y., Pommaret, A., Paolini, V., Pors, I., Chartier, C., 2005, Administration of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to goats to control gastro-intestinal nematodes: dose trials. *Veterinary Research* 36, 157-166.

- Parkins, J.J., Holmes, P.H., 1989, Effects of gastrointestinal helminth parasites on ruminant nutrition. *Nutrition Research Review* 2, 227-246.
- Perevolotsky, A., 1994, Tannins in Mediterranean woodlands species: lack of response to browsing and thinning. *Oikos* 71, 333-340.
- Pérez, J., Garcia, P.M., Hernandez, S., Martínez-Moreno, A., Martín De Las Mulas, J., Camara, S., 2001, Pathological and immunohistochemical study of the abomasum and abomasal lymph nodes in goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Research* 32, 463-473.
- Pérez, J., Garcia, P.M., Hernandez, S., Mozos, E., Camara, S., Martinez-Moreno, A., 2003, Experimental haemonchosis in goats: effects of single and multiple infections in the host response. *Veterinary Parasitology* 111, 333-342.
- Pérez, J., Zafra, R., Buffoni, L., Hernandez, S., Camara, S., Martinez-Moreno, A., 2008, Cellular phenotypes in the abomasal mucosa and abomasal lymph nodes of goats infected with *Haemonchus contortus*. *Journal of Comparative Pathology* 138 102-107.
- Perry, B.D., Randolph, T.F., 1999, Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. *Veterinary Parasitology* 84, 145-168.
- Plotkin, M.J., 2000, *Medicine quest. In search of nature's healing secrets*. Viking Press, New York, 224 p.
- Plumlee, K.H., Johnson, B., Galey, F.D., 1998, Comparison of disease in calves dosed orally with oak or commercial tannic acid. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10, 263-267.
- Pollott, G.E., Karlsson, L.J.E., Eady, S., Greeff, J.C., 2004, Genetic parameters for indicators of host resistance to parasites from weaning to hogget age in Merino sheep. *J. Anim. Sci.* 82, 2852-2864.
- Pomroy, W.E., 2006, Anthelmintic resistance in New Zealand: A perspective on recent findings and options for the future *New Zealand Veterinary Journal* 54, 265-270.
- Poncet-Legrand, C., Edelmann, A., Putaux, J.L., Cartalade, D., Sarni-Manchado, P., Vernhet, A., 2006, Poly(l-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids* 20, 687-697.
- Prichard, R.K., Hall, C.A., Kelly, J.D., Martin, I.C.A., Donald, A.D., 1980, The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Australian Veterinary Journal* 56, 239-250.
- Priolo, A., Lanza, M., Biondi, L., Pappalardo, P., Young, O.A., 1998, Effect of partially replacing dietary barley with 20% carob pulp on postweaning growth, and carcass and meat characteristics of Comisana lambs. *Meat Science* 50, 355-363.
- Provenza, F.D., Lynch, J.J., Cheney, C.D., 1995, Effects of a flavor and food restriction on the response of sheep to novel foods. *Applied Animal Behaviour Science* 43, 83-93.
- Provenza, F.D., Villalba, J.J., 2010, The role of natural plant products in modulating the immune system: An adaptable approach for combating disease in grazing animals. *Small Ruminant Research* 89, 131-139.
- Provenza, F.D., Villalba, J.J., Dziba, L.E., Atwood, S.B., Banner, R.E., 2003, Linking herbivore experience, varied diets, and plant biochemical diversity. *Small Ruminant Research* 49, 257-274.

- Provenza, F.D., Villalba, J.J., Haskell, J., MacAdam, J.W., Griggs, T.C., Wiedmeier, R.D., 2007, The value to herbivores of plant physical and chemical diversity in time and space. *Crop Science* 47, 382-398.
- Quiroz Romero, H., 1999, *Parasitología y enfermedades de animales domésticos*, 8 Edition. Editorial LIMUSA, S.A de C.V., UTEHA, Grupo Noriega Editores, México D.F., 876 p.
- Rahman, W., A., Collins, G.H., 1990a, The Establishment and Development of *Haemonchus contortus* in Goats. *Veterinary Parasitology* 35, 189-193.
- Rahman, W.A., Collins, G.H., 1990b, Changes in liveweight gain, blood constituents and worm egg output in goats artificially infected with a sheep-derived strain of *Haemonchus contortus*. *British Veterinary Journal* 146, 543-550.
- Rahman, W.A., Collins, G.H., 1991, Infection of goats with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*: histopathology and pH changes. *British Veterinary Journal* 147, 569-574.
- Rahman, W.A., Hamid, S.A., 2007, Morphological characterization of *Haemonchus contortus* in goats (*Capra hircus*) and sheep (*Ovis aries*) in Penang, Malaysia. *Tropical Biomedicine* 24, 23-27.
- Raj Narayana, K., Sripal Reddy, M., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R., 2001, Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology* 33, 2-16.
- Ramírez-Restrepo, C.A., Barry, T.N., 2005, Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 120 179-201.
- Ramos, G., Frutos, P., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., 1998, Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Plants secondary compounds in herbivores nutrition. Archivos de Zootecnia* 47, 597-620.
- Raynaud, J.P., 1970, Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équins et porcins. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 45, 321-342.
- Reed, J.D., 1995, Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science* 73, 1516-1528.
- Relling, A.E., Pinos-Rodríguez, J.M., Mattioli, G.A., 2011, Un acercamiento a la relación de las hormonas gastrointestinales con el consumo de alimento en rumiantes. An approach to the association between gastrointestinal hormones and dry matter intake in ruminants. *Agrociencia* 45, 561-572.
- Richelle, M., Tavazzi, I., Offord, E., 2001, Comparison of the antioxidant activity of commonly beverages (coffee, cacao, and tea) prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3438-3442.
- Rios-De Alvarez, L., Greer, A.W., Jackson, F., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Huntley, J.F., 2008, The effect of dietary Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on local cellular responses to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Parasitology* 135, 1117-1124.
- Rochfort, S., Parker, A.J., Dunshea, F.R., 2008, Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry* 69 299-322.

- Roeber, F., Jex, A., Gasser, R., 2013, Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasites & Vectors* 6, 153.
- Rogers, W.P., 1982, Enzymes in the exsheathing fluid of nematodes and their biological significance. *International Journal for Parasitology* 12, 495-502.
- Rogers, W.P., Sommerville, R.I., 1963, The infective stage of nematode parasites and its significance in parasitism. *Advances in Parasitology* 1, 109-171.
- Rogers, W.P., Sommerville, R.I., 1968, The infectious process and its relation to the development of early parasitic stages of nematodes. *Advances in Parasitology* 6, 327-348.
- Römbke, J., Krogh, K., Moser, T., Scheffczyk, A., Liebig, M., 2010, Effects of the Veterinary Pharmaceutical Ivermectin on Soil Invertebrates in Laboratory Tests. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 332-340.
- Roos, M.H., Boersema, J.H., Borgsteede, F.H.M., Cornelissen, J., Taylor, M., Ruitenbergh, E.J., 1990, Molecular analysis of selection for benzimidazole resistance in the sheep parasite *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 43 77-88.
- Rossanigo, C.E., Gruner, L., 1996, The length of strongylid nematode infective larvae as a reflection of developmental conditions in faeces and consequences on their viability. *Parasitology Research* 82, 304-311.
- Rossi, P., 1983, Sur le genre *Nematodirus* Ransom, 1907 (Nematoda: Trichostrongyloidea). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 58, 557-581.
- Russell, R.L., Cassada, R.C., 1975, The Dauerlarva, a Post-Embryonic Developmental Variant of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 46, 326-342.
- Saddiqi, H.A., Jabbar, A., Sarwar, M., Iqbal, Z., Muhammad, G., Nisa, M., Shahzad, A., 2011, REVIEW: Small ruminant resistance against gastrointestinal nematodes: a case of *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research* 109, 1483-1500.
- Sager, H., Hosking, B., Bapst, B., Stein, P., Vanhoff, K., Kaminsky, R., 2009, Efficacy of the amino-acetonitrile derivative, monepantel, against experimental and natural adult stage gastro-intestinal nematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology* 159, 49-54.
- Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Kadan, S.S., 1990, Dietary tannins: consequences and remedies. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, 200 p.
- Sansom-Himmelsjerna, G.V., 2007, Mode of action of current anthelmintic drug classes. In: *Anthelmintics and resistance : a review*.
- Sansom-Himmelstjerna, G.V., 2007a, Mechanisms of resistance to anthelmintics in nematodes. In: *Anthelmintics and resistance: a review*. NOVARTIS (Ed.), Switzerland, 29-33 pp.
- Sansom-Himmelstjerna, G.V., 2007b, Mode of action of current anthelmintic drug classes. In: *Anthelmintics and resistance: a review*. NOVARTIS (Ed.), Switzerland, 22-26 pp.
- Samuel, W.M., Pybus, M.J., Kocan, A., A., 2001, Parasitic diseases of wild mammals.

- Sandoval-Castro, C.A., Lizarraga-Sanchez, H.L., Solorio-Sanchez, F.J., 2005, Assessment of tree fodder preference by cattle using chemical composition, in vitro gas production and in situ degradability. *Animal Feed Science and Technology* 123-124 Part 1, 277-289.
- Sanger, N.C., Gill, J., 1999, Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitology Today* 15, 141-146.
- Scott, I., Hodgkinson, S.M., Lawton, D.E.B., Khalaf, S., Reynolds, G.W., Pomroy, W.E., Simpson, H.V., 1998, Infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*: gastrin. *International Journal for Parasitology* 28, 1393-1401.
- Scott, I., Pomroy, W.E., Kenyon, P.R., Smith, G., Adlington, B., Moss, A., 2013, Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology* 198, 166-171.
- Schallig, H.D., Van Leeuwen, M.A., 1997, Protective immunity to the blood-feeding nematode *Haemonchus contortus* induced by vaccination with parasite low molecular weight antigens. *Parasitology* 114, 293-299.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001a, Analysis of condensed tannins a review. *Animal Feed Science and Technology* 91, 21-40.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001b, Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* 91, 21-40.
- Seguin, A. 1797. Rapport au Comite de Salut public sur les nouveaux moyens de tanner les cuirs proposés par le citoyen Armand Seguin. In *Annales de chimie ou recueil de mémoires concernant la chimie et les arts qui en dépendent*, t. 19 (Paris), pp. 15-77.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Kaplan, R.M., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2006, *Sericea lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Veterinary Parasitology* 139, 150-157.
- Silanikove, N., Gilboa, N., Perevolotsky, A., Nitsan, Z., 1996, Goats fed tannin-containing leaves do not exhibit toxic syndromes. *Small Ruminant Research* 21, 195-201.
- Silanikove, N., Landau, S., Or, D., Kababya, D., Bruckental, I., Nitsan, Z., 2006, Analytical approach and effects of condensed tannins in carob pods (*Ceratonia siliqua*) on feed intake, digestive and metabolic responses of kids. *Livestock Science* 99, 29- 38.
- Silanikove, N., Perevolotsky, A., Provenza, F.D., 2001, Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 91, 69-81.
- Silva, M.M., Santos, M.R., Caroço, G., Rocha, R., Justino, G., Mira, L., 2002, Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids: A Re-examination. *Free Radical Research* 36, 1219–1227.
- Silvestre, A., Leignel, V., Berrag, B., Gasnier, N., Humbert, J.F., Chartier, C., Cabaret, J., 2002, Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. *Veterinary Research* 33, 465-480.
- Simcock, D.C., Joblin, K.N., Scott, I., Burgess, D.M., Rogers, C.W., Pomroy, W.E., Simpson, H.V., 1999, Hypergastrinaemia, abomasal bacterial population densities and pH in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. *International Journal for Parasitology* 29, 1053-1063.

- Simpson, H.V., 2000, Review: Pathophysiology of Abomasal Parasitism: Is the Host or Parasite Responsible? *The Veterinary Journal* 160, 177-191.
- Singh, B., Bhat, T.K., Sharma, O.P., 2001, Biodegradation of tannic acid in an in vitro ruminal system. *Livestock Production Science* 68, 259-262.
- Skene, I.K., J.D., B., 1995, Characterization of tannin acylhydrolase activity in the ruminal bacterium *Selenomonas uiminantium*. *Anaerobe*, 1321-1327.
- Smith, M.C., Sherman, D.M., 1994, *Goat Medicine*. Lea and Febiger, Baltimore, USA, 825 p.
- Sokerya, S., 2009. The effect of cassava foliage (*Manihot esculenta*) on gastrointestinal parasites of small ruminants in Cambodia. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences Uppsala, Sweden.
- Sommerville, R.I., Rogers, W.P., 1987, The nature and action of host signals. *Advances in Parasitology* 26, 239-293.
- Song, J.H., Kim, S.K., Chang, K.W., Han, S.K., Yi, H.K., Jeon, J.G., 2006, In vitro inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Archives Oral Biology* 51, 1131-1140.
- Song, J.M., Lee, K.H., Seong, B.L., 2005, Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Research* 68, 66-74.
- Sonstegard, T.S., Gasbarre, L.C., 2001, Genomic tools to improve parasite resistance. *Veterinary Parasitology* 101, 387-403.
- Soulsby, E.J.L., 1982, *Helminths, Arthropods and Protozoa of domesticated animals*, 7th Edition Edition. Bailliere Tindall, London, 809 p.
- Sréter, T., Kassai, T., Takács, E., 1994, The heritability and specificity of responsiveness to infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *International Journal for Parasitology* 24, 871-876.
- Stear, M.J., Bairden, K., Bishop, S.C., Gettinby, G., Mc Kellar, Q.A., Park, M., Strain, S., Wallace, D.S., 1998, The processes influencing the distribution of parasitic nematodes among naturally infected lambs. *Parasitology* 117, 165-171.
- Stiernagle, T. 2006. Worm Book. The online review of *C.elegans* Biology. In Maintenance of *C. elegans* (Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455 USA).
- Streit, W., Fengel, D., 1994, Purified tannins from quebracho colorado. *Phytochemistry* 36, 481-484.
- Stromberg, B.E., Gasbarre, L.C., 2006, Gastrointestinal Nematode Control Programs with an Emphasis on Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 22, 543-565.
- Strong, L., James, S., 1993, Some effects of ivermectin on the yellow dung fly, *Scatophaga stercoraria*. *Veterinary Parasitology* 48, 181-191.
- Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y., Amano, F., Okubo, T., Aoi, N., Iwaki, M., Kumagai, S., 1999, Epigallocatechin gallate and gallic acid inhibit extracellular release of Vero toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1472, 42-50.
- Sumano López, H.S., Ocampo Camberos, L., 2006, *Farmacología veterinaria*, Vol 3 Edition. McGraw-Hill, Madrid, España, 1082 p.

- Sykes, A.R., Coop, R.L., 1976, Intake and utilization of food by growing lambs with parasitic damage to the small intestine caused by daily dosing with *Trichostrongylus colubriformis* larvae. *The Journal of Agricultural Science* 86, 507-515.
- Sykes, A.R., Coop, R.L., 1977, Intake and utilization of food by growing sheep with abomasal damage caused by daily dosing with *Ostertagia circumcincta* larvae. *The Journal of Agricultural Science* 88, 671-677.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2012. *Plant Physiology*. On line (Sinauer).
- Talavera, S., Aedo, C., Castroviejo, S., Herrero, A., Romero Zarco, C., Sáez, L., Salgueiro, F.J., Velayos, M., 1999, *Flora ibérica. Plantas vasculares de la península Ibérica e islas Baleares, Vol VII (I). Leguminosae (partim)*. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Tamir, M., Nachtom, E., Alumot, E., 1971, Degradation of tannins from carob pods (*Ceratonia siliqua*) by thioglycolic acid. *Phytochemistry* 10, 2769-2774.
- Terrill, T.H., Douglas, G.B., Foote, A.G., Purchas, R.W., Wilson, G.F., Barry, T.N., 1992a, Effects of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture. *The Journal of Agricultural Science* 119, 265-273.
- Terrill, T.H., Dykes, G.S., Shaik, S.A., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2009, Efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats: Dose titration study. *Veterinary Parasitology* 163, 52-56.
- Terrill, T.H., Mosjidis, J.A., Moore, D.A., Shaik, S.A., Miller, J.E., Burke, J.M., Muir, J.P., Wolfe, R., 2007, Effect of pelleting on efficacy of Sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats. *Veterinary Parasitology* 146, 117-122.
- Terrill, T.H., Rowan, A.M., Douglas, G.B., Barry, T.N., 1992b, Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 58, 321-329.
- Terrill, T.H., Waghorn, G.C., Woolley, D.J., Mc Nabb, W.C., Barry, T.N., 1994, Assay and digestion of ¹⁴C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. *British Journal of Nutrition* 72, 467-477.
- Thamsborg, S.M., Mejer, H., Bandier, M., Larsen, M., 2003. Influence of different forages on gastrointestinal nematode infections in grazing lambs. In: *The 19th International Conferences of WAAVP*, New Orleans, USA, p. 189.
- Thamsborg, S.M., Roepstorff, A., Larsen, M., 1999, Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. *Veterinary Parasitology* 84, 169-186.
- Theodorou, M.K., Barahona, R., Kingston-Smith, A., Sanchez, S., Lascano, C., Owen, E., Morris, C., 1999. News perspectives on the degradation of plant biomass in the rumen in the absence and presence of condensed tannins. In: *Tannins in livestock and human nutrition: ACIAR Proceedings (BROOKER, ed.)*, Camberra, Australia.

- Thompson, D.P., Geary, T.C., 1995, The structure and function of helminth surfaces. In Hemingway, R.W. and Karchey, J.J. (Eds.), *Chemistry and significance of Condensed Tanins*, In: Plenum Press, New York, pp. 417-433.
- Torres-Acosta, J.F., 1999, Supplementary feeding and the control of gastrointestinal nematodes of goats in Yucatan. The Royal Veterinary College. University of London, London.
- Torres-Acosta, J.F., Jacobs, D.E., Aguilar-Caballero, A., Sandoval-Castro, C., May-Martinez, M., Cob-Galera, L.A., 2004, The effect of supplementary feeding on the resilience and resistance of browsing Criollo kids against natural gastrointestinal nematode infections during the rainy season in tropical Mexico. *Veterinary Parasitology* 124, 217-238.
- Tzamaloukas, O., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Huntley, J., 2006, The effect of chicory (*Cichorium intybus*) and sulla (*Hedysarum coronarium*) on larval development and mucosal cell responses of growing lambs challenged with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitology* 132, 419-426.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Jennings, F.W., Dunn, A.M., 1996, *Veterinary Parasitology*, Second Edition. Blackwell Sciences Ltd. A Blackwell Publishing Company, Oxford. UK, 307 p.
- Valderrábano, J., Delfa, R., Uriarte, J., 2002, Effect of level of feed intake on the development of gastrointestinal parasitism in growing lambs. *Veterinary Parasitology* 104, 327-338.
- Valdés, B., 2006, *Onobrychis* Mill., In: *Flora ibérica. Plantas vasculares de la península Ibérica e islas Baleares: (Castroviejo, S. et al.)*. Real Jardín Botánico. CSIC, Madrid, pp. 955-970.
- Van Wyk, J.A., Bath, G.F., 2002, The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research* 33, 509-529.
- van Wyk, J.A., Hoste, H., Kaplan, R.M., Besier, R.B., 2006, Targeted selective treatment for worm management-How do we sell rational programs to farmers? *Veterinary Parasitology* 139, 336-346.
- Vargas-Magaña, J.J., Aguilar-Caballero, A.J., Torres-Acosta, J.F., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Capetillo-Leal, C.M., 2013, Tropical tannin-rich fodder intake modifies saliva-binding capacity in growing sheep. *Animal: an international journal of animal bioscience* 7, 1921-1924.
- Vatta, A.F., Letty, B.A., Van Der Linde, M.J., Van Wijk, E.F., Hansen, J.W., Krecek, R.C., 2001, Testing for clinical anaemia caused by *Haemonchus* spp. in goats farmed under resource-poor conditions in South Africa using an eye colour chart developed for sheep. *Veterinary Parasitology* 99 1-14.
- Veneziano, V., Rinaldi, L., Caputo, A.R., Fedele, V., Gringoli, G., 2007, Effects of gastrointestinal strongyle parasitism on milk quality. In: *The quality of goat products (IGA-CRA, ed.)*, pp. 142-145, Bella, Italy.
- Villalba, J.J., Provenza, F.D., Shaw, R., 2006, Sheep self-medicate when challenged with illness-inducing foods. *Animal Behaviour* 71, 1131-1139.
- Viney, M.E., Lok, J.B., 2007, *Strongyloides* spp. The *C. elegans* Research Community, WormBook.
- Waghom, G.C., Douglas, G.B., Niezen, J.H., McNabb W.C., Foote, A.G., 1998, Forages with condensed tannins – their management and nutritive value for ruminants. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 60, 89-98

- Waghorn, G., 2008, Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology* 147, 116-139.
- Waghorn, G., Mc Nabb, W.C., 2003, Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 383-392.
- Waghorn, G., Ulyatt, M.J., John, A., Fisher, M.T., 1987, The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus*. *British Journal of Nutrition* 57, 115-126.
- Waghorn, G.C., Shelton, I.D., McNabb W.C., McCutcheon, S.N., 1994a, Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its value for sheep. 2. Nitrogenous aspects. *The Journal of Agricultural Science* 123 109-119.
- Waghorn, G.C., Shelton, I.D., W.C., M., 1994b, Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its value for sheep. 1. Non-nitrogenous aspects. *The Journal of Agricultural Science* 123, 99-107.
- Wall, R., Strong, L., 1987, Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug ivermectin. *Nature* 327, 418-421.
- Waller, P.J., 1999, International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology* 29, 155-164.
- Waller, P.J., 2006a, From discovery to development: Current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Veterinary Parasitology* 139, 1-14.
- Waller, P.J., 2006b, Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Animal Feed Science and Technology* 126 277-289.
- Waller, P.J. 2007. Anthelmintics and resistances: A review (Novartis Animal Health Inc. Basel, Switzerland).
- Waller, P.J., Bernes, G., Thamsborg, S.M., Sukura, A., Richter, S.H., Ingebrigtsen, K., Höglund, J., 2001, Plants as de-worming agents of livestock in the nordic countries : historical perspective, popular beliefs and prospects for the future. *Acta Veterinaria Scandinavica* 42, 31-44.
- Waller, P.J., Thamsborg, S.M., 2004, Nematode control in green ruminant production systems. *Trends in Parasitology* 20, 493-497.
- Wang Y, W.G., McNabb WC, Barry TN, Hedley MJ and Shelton ID, Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon the digestion of methionine and cysteine in the small intestine of sheep. *J Agric Sci (Camb)* 127:413–421 (1996).
- Wardhaugh, K.G., Rodriguez-Menendez, H., 1988, The effects of the antiparasitic drug, Ivermectin, on the development and survival of a dung breeding fly, *Orthelia cornicina* (Fabr.) and the scarabaeine dung beetle, *Copris hispanus* L., *Bubas bubalus* (Olivier) and *Onitis belial* F. *Journal of Applied Entomology* 106, 381-389.
- Waterman, P.G., 1999. The tannins - an overview. In *Tannins in Livestock and Human Nutrition*. In: *Proceedings of International Workshop, Australian Centre for International Agricultural Research, Adelaide, Australia*, pp. 10-13.

- White, J.D., 1993, Neuropeptide Y: a central regulator of energy homeostasis. *Regulatory Peptides* 49, 93-107.
- Williams, J.C., 1997, Anthelmintic treatment strategies: current status and future. *Veterinary Parasitology* 72, 461-477.
- Windon, R.G., 1996, Genetic control of resistance to helminths in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 54, 245-254.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N.C., 2004, Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology* 20, 469-476.
- Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone, J., J.B., , Pankavich, J.A., Reinecke, R.K., Slocombe, O., Taylor, S.M., Vercruysse, J., 1995, World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology* 58, 181-213.
- Woolaston, R.R., Barger, I.A., Piper, R.L., 1990, Response to helminth infection of sheep selected for resistance to *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology* 20, 1015-1018.
- Yamaguchi, K., Honda, M., Ikigai, H., Hara, Y., Shimamura, T., 2002, Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) *Antiviral Research* 53, 19-34.
- Yan, F., Xu, L., Liu, L., Yan, R., Song, X., Li, X., 2010, Immunoproteomic analysis of whole proteins from male and female adult *Haemonchus contortus*. *The Veterinary Journal* 185, 174-179.
- Yatsuda, A.P., Krijgsveld, J., Cornelissen, A.W.C.A., Heck, A.J.R., de Vries, E., 2003, Comprehensive Analysis of the Secreted Proteins of the Parasite *Haemonchus contortus* Reveals Extensive Sequence Variation and Differential Immune The *Journal of Biological Chemistry* 278, 16941-16951.
- Zayas, H.M., 2005, Spanish Chemical and Pharmaceutical Glossary: English-Spanish, Spanish-English. Schreiber, Shengold Publishing; Bilingual edition, USA, 284 p.
- Zeiger, E., Taiz, L., 2007, *Fisiología vegetal*, Vol 1.
- Zhao, G., Yan, R., Muleke, C.I., Sun, Y., Xu, L., Li, X., 2012, Vaccination of goats with DNA vaccines encoding H11 and IL-2 induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. *The Veterinary Journal* 191, 94-100.
- Zhu, J., Filippish, L.J., Alsalami, M.T., 1992, Tannic acid intoxication in sheep and mice. *Research in Veterinary Science* 53, 280-292.
- Zimmer, N., Cordesse, R., 1996, Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Productions Animales* 9, 167-179.

LISTADO DE TABLAS, FIGURAS Y FOTOS / *LIST OF TABLES, FIGURES AND PHOTOS*

Tablas:

- Tabla 1:** Clasificación sistemática según (Urquhart *et al.*, 1996) y ^{**}(Anderson, 2000). Localización anatómica de los principales vermes parásitos de pequeños rumiantes y hospedadores principales (Waller, 2007)
- Tabla 2:** Desarrollo de *C. elegans* a diferentes temperaturas de crecimiento (Altun and Hall, 2009) (Basado en (Byerly *et al.*, 1976)
- Tabla 3:** Familias de Antihelmínticos, principales moléculas activas con efecto antiparasitario en pequeños rumiantes. Espectro de actividad: Nematodos: SGI: Estróngilos Gastro-Intestinales, SR: Estróngilos respiratorios, Trematodos: *Fasciola hepática*, Cestodos, Ácaros y/o Insectos y blanco esperado en los vermes (Sumano López and Ocampo Camberos, 2006; Kaminsky *et al.*, 2008)
- Tabla 4:** Algunos de los flavonoides más importantes (Naczk and Shahidi, 2004; Zayas, 2005)
- Tabla 5:** Clasificación de los monómeros constituyentes de los Taninos Condensados, clases de Homopolímeros y grupos hidroxilo asociados
- Tabla 6:** Clasificación Test *in vitro*, etapas clave del ciclo a las que van dirigidos y efectos en la biología de los NGIs.....

Figuras:

- Figura 1:** Formas básicas del esófago encontradas en nemátodos (Urquhart *et al.*, 1996)
- Figura 2:** Sección longitudinal a) Sistema nervioso, excretor y digestivo, b) Sistema reproductor hembra (arriba) y macho (abajo)
- Figura 3:** Bursa copulatrix machos. (Urquhart *et al.*, 1996)
- Figura 4:** Ciclo biológico Trichostrongyloides típico y Ciclo biológico de *Nematodirus* spp.....
- Figura 5:** Ciclo Biológico de *C. elegans* a 22°C. (Altun *et al.*, 2012).....
- Figura 6:** Etapas de desarrollo larvario *Caenorhabditis elegans*
- Figura 7:** Identificación de huevos en las heces de pequeños rumiantes Nematodos: Strongylidos, Strongyloides, Nematodirus. Cestodos: Moniezia, Trematodos: *Fasciola hepática*
- Figura 8:** Modelo de lucha integrada organizado en torno a 3 ejes de acción: 1) Actuar sobre la fuente contaminación, 2) Mejora de la resistencia del hospedador y 3) Modulación de la biología de los nematodos gastrointestinales del hospedador
- Figura 9:** Biosíntesis de fenilpropanoides, estilbenos, lignanos, ligninas, suberinas, flavonoides y taninos a partir de la fenilalanina (Naczk and Shahidi, 2004)
- Figura 10:** Biosíntesis de proantocianidinas (Taninos Condensados) y Antocianidinas. Enzimas: chalcona sintasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI), flavanona-30-hidroxilasa (F30H), flavanona-3-hidroxilasa (F3H), dihidroflavanol reductasa (DFR), leucoantocianidín reductasa (LAR), antocianín

sintasa (ANS), flavanol-UDP-glucosil transferasa (FGT), glutatión-S-transferasa (GST) (Aerts et al., 1999)

Figura 11: Esqueleto carbonado básico de los Flavonoides basado en: (Silva et al., 2002; Zeiger and Taiz, 2007)

Figura 12: Estructura molecular de: a) Taninos Hidrolizables: Ácidos Gálico y Elágico (Izda.), b) Taninos Condensados o Proantocianidinas (Dcha.) (Naczk and Shahidi, 2004)

Figura 13: Estructura química de los Flavan-3-ols (Sugita-Konishi et al., 1999)

Fotos:

Foto 1: *Teladorsagia circumcincta* Macho 10X0.25 Magnificación. (Arroyo López, C. 2011)

Foto 2: *Teladorsagia circumcincta* Hembra 10X0.25 Magnificación. (Arroyo López, C. 2011)

Foto 3: *T. colubriformis* Macho (izda.), 10X0.25 Magnificación. (Arroyo López, C. 2011)

Foto 4: *T. vitrinus* Macho (dcha.). 10X0.25 Magnificación. (Arroyo López, C. 2011)

Foto 5: *N. battus* Macho (izda.) 10X0.25 Magnificación

Foto 6: Detalle dilatación cuticular cefálica *Nematodirus spp.* Hembra (dcha.) 10X0.40 Magnificación. (Arroyo López, C. 2011)